

N° d'ordre :

THESE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Mécanique Energétique Génie Civil et Procédés

Spécialité : Génie des Procédés et Environnement

Par M. Huberson AKIN

Titre de la thèse Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de
moûts de raisins : modélisation et interprétation métabolique

Soutenue le 10 Mars 2008 à 10 heures devant le jury composé de :

M.	Jean-Michel SALMON	Président
M.	Pierre STREHAIANO	Directeur de thèse
M.M	Xuân Mi MEYER	Codirecteur de thèse
M.	Christian LARROCHE	Rapporteur
M.	Cédric BRANDAM	Membre
M.	Gilles TRYSTAM	Membre
M.	Jacques BLOUIN	Membre

<u>I.</u>	<u>Introduction.....</u>	1
II.	Eude bibliographique.....	4
II.1.	Acidité et pH des moûts et des vins	4
II.2.	Les principaux constituants des moûts et des vins	8
II.2.1.	Les sucres du moût et leur utilisation.....	8
II.2.2.	Les acides organiques.....	9
II.2.2.1.	Acides organiques des moûts	10
II.2.2.2.	Acides organiques issus de la fermentation alcoolique.....	11
II.2.3.	Alcools : éthanol.....	12
II.2.4.	Polyalcools : glycérol	13
II.3.	Les substances azotées du moût et leur utilisation par la levure.	13
II.3.1.	Les différentes formes d'azote	13
II.3.1.1.	Les ions ammonium.....	14
II.3.1.2.	Les acides aminés	15
II.3.1.3.	Les peptides et polypeptides (protéines)	16
II.3.2.	Métabolisme des acides aminés	17
II.3.3.	Evolution des constituants azotés du moût au vin.....	18
II.3.4.	La matière minérale.....	18
II.3.4.1.	Les cations	19
II.3.4.2.	Les anions	19
II.4.	Les transports membranaires.....	20
II.4.1.	Les protéines membranaires de transports	21

II.4.1.1. Les canaux	21
II.4.1.2. Les pompes et les transporteurs	22
II.4.2. Les différents types de transports	22
II.4.2.1. Les diffusions.	23
i. La diffusion simple.....	23
ii. La diffusion facilitée.	23
II.4.2.2. Les transports actifs.	24
i. Transport actif primaire.....	24
ii. Transport actif secondaire.	25
II.4.3. Le transport des sucres	26
II.4.4. Le transport des ions ammonium	27
II.4.5. Le transport des acides aminés.....	29
II.4.5.1. Le transporteur GAP.....	29
II.4.5.2. Les systèmes de transporteurs spécifiques	30
II.4.6. Transport des peptides et des polypeptides	33

III. Matériels et méthodes..... 34

III.1. La souche de levure	34
III.2. Les milieux d'activation.....	34
III.3. Les milieux de fermentation.....	35
III.3.1. Les milieux synthétiques	35
III.3.2. Le moût de raisins	36
III.4. Le matériel de fermentation	37
III.4.1. Les fermenteurs du laboratoire SPO-INRA de Montpellier.....	37

III.4.2. Les fermenteurs du laboratoire de génie chimique de Toulouse.....	38
III.5. Techniques analytiques	39
III.5.1. Concentration cellulaire	39
III.5.2. Dosage des sucres totaux par la méthode du DNS.....	40
III.5.3. Dosage des acides organiques, du glycérol et de l'alcool	41
i. Dosage à l'HPLC	41
ii. Dosages enzymatiques au Mascot Plus	41
- Dosage enzymatique acide malique par kit Mono réactif.....	41
- Dosage colorimétrique acide tartrique par kit mono réactif	42
III.5.4. Dosage de l'azote	42
i. Dosage des ions ammonium (NH_4^+).....	43
ii. Dosage de l'azote alpha aminé.....	43
iii. Dosage des acides aminés	43
III.5.5. Dosage du CO_2 dégagé.....	46
IV. Modèle de calcul du pH.....	48
IV.1. pH et composés des moûts de raisins	48
IV.1.1. Le sucre	49
IV.1.2. L'alcool	49
IV.1.3. Les composés acides : acides organiques.....	50
IV.1.4. Les sources azotées	51
IV.1.4.1. Les ions ammonium (NH_4^+).....	51
IV.1.4.2. Les acides aminés des moûts de raisins	53
IV.1.5. Conclusion.....	57

IV.2. Equations du modèle du calcul du pH.....	57
IV.2.1. Notion de potentiel d'hydrogène (pH)	57
IV.2.2. Loi de conservation de la matière	59
IV.2.2.1. L'ammoniac	60
IV.2.2.2. Les acides organiques	61
IV.2.2.3. les acides aminés	61
IV.2.3. Equations constitutives.....	62
IV.2.3.1. Masse volumique	62
IV.2.3.2. Notion de force ionique.....	63
IV.2.3.3. Evaluation du coefficient d'activité	63
i. Loi de Debye-Hückel	64
ii. Convention de MacInnes.....	65
IV.2.3.4. Constante diélectrique.....	66
IV.2.3.5. Constantes de dissociation des acides organiques	67
IV.2.4. Equations de contraintes.....	69
IV.2.4.1. Equations d'équilibres chimiques	69
i. Acides organiques	69
ii. Les acides aminés.....	70
iii. Dissociation de l'eau	71
IV.2.4.2. Electroneutralité d'une solution	71
IV.3. Formulation et résolution du modèle	72
IV.3.1. Formulation du modèle	72
IV.3.2. Méthode de résolution et diagramme du modèle	75

IV.4. Validation du modèle	76
IV.4.1. Simulation du pH de milieux synthétiques composés.....	76
IV.4.2. Ajout de composés à différentes concentrations sur moût réel	78
IV.4.3. Ethanol : Comparaison pH mesuré et simulé	78
IV.4.4. Acides organiques : Comparaison pH mesuré et simulé.....	79
IV.5. Conclusion.....	80
V. Application du modèle de calcul du pH.....	81
V.1. Fermentation sur moût synthétique avec NH_4^+ comme seule source azotée.....	81
V.1.1. Résultats et discussion.....	82
V.1.2. Comparaison pH expérimental et simulé	83
V.2. Fermentation sur moût synthétique avec des acides aminés comme seule	
source azotée	85
V.2.1. Résultats de la fermentation et discussions	85
V.2.2. Hypothèses sur l'impact de l'assimilation des acides aminés sur l'évolution	
du pH.	91
V.2.3. Simulation de la cinétique du pH expérimental	94
V.3. Fermentation sur moût synthétique contenant du NH_4^+ et des acides	
aminés : milieu MS300	95
V.3.1. Résultats de la fermentation et discussions	96
V.3.2. Analyse comparative des cinétiques sur les trois milieux synthétiques de	
fermentation	97
V.3.3. Evaluation de la proportion des acides aminés en fonction de leur charge.	
.....	99

V.3.4. Simulation de la cinétique du pH expérimental	99
V.4. Cas de la fermentation alcoolique sur moût réel	100
V.4.1. Résultats de la fermentation et discussions	101
V.4.2. Evaluation de la proportion des acides aminés en fonction de leur charge	103
V.4.3. Simulation de la cinétique du pH expérimental	104
VI. Conclusions et perspectives	107
References bibliographiques	110
Annexe	121

LISTE DE FIGURES

Figure II.1. Flux diffusif selon la loi de Fick (http://www.sciencebio.com/FacBio/BioCell/Membrane/FBMF5.htm)	23
Figure II.2. Schéma d'un transports actif primaire : cas de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. On a une sortie de 3 Na^+ pour une entrée de 2 K^+ .	25
Figure II.3. Schéma d'un transports actif secondaire : antiport et symport actifs	25
Figure II.4. Simulation du taux spécifique de production de protons (qH^+ , mmol h ⁻¹ par g de biomasse). Source d'azote : ion ammonium (Castrillo J.I et coll., 1995).	28
Figure II. 5. Schéma de fonctionnement de l'uniport électrophorétique accumulatif responsable de l'entrée de l'ion ammonium chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Salmon J.M., 1998).	28
Figure II.6. Schéma de fonctionnement du symport électrophorétique accumulatif responsable de l'entrée d'acide aminé chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Salmon J.M., 1998).	32
Figure III.1. Les différents types de fermenteurs utilisés dans cette étude.	38
Figure III.2. Correction du CO_2 dégagé par extrapolation linéaire	47
Figure. IV.1. Cinétique classique du pH lors d'une fermentation alcoolique sur du moût de raisins blancs par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (pH initial : 3,32 ; Température : 20°C)	48
Figure IV.2. Evolution du pH en fonction du degré alcoolique du moût de raisins blancs. Test réalisé à 20°C.	50
Figure IV.3. Test d'ajout d'acide succinique dans un moût de raisins blancs à différents degrés d'alcool réalisé à 20°C. (pH à $\pm 0,05$).	51
Figure. IV.4. Courbe de titrage acido-basique de 1L de solution à 1M de NH_4^+ : évolution des proportions des formes acido-basiques.	52
Figure. IV.5. Evolution des proportions des formes acido-basiques des acides alpha aminés. (http://www.scifa.univ-metz.fr/cours/MPARANT/3a---Acides-amines-CM-Etudiant.pdf)	55
Figure IV.6. Digramme de calcul du pH de moûts synthétiques et naturels	76
Figure.V.1. Evolution de l'éthanol, de la biomasse, du dioxyde de carbone, du pH et de l'ammonium au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_NH_4 .	82
Figure.V.2. Evolution de l'acide malique, de l'acide citrique, de l'acide succinique, de l'acide acétique et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_NH_4 .	82
Figure. V.3. Comparaison des évolutions de pH expérimental et simulé. Fermentation sur milieu MS_NH_4 .	84
Figure.V.4. Evolution de l'éthanol, de la biomasse, du dioxyde de carbone, du pH et de l'ammonium au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_AA .	86
Figure.V.5. Evolution de l'acide malique, de l'acide citrique, de l'acide succinique, de l'acide acétique et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_AA .	86
Figure.V.6.a. Taux d'avancement de la consommation des acides aminés mono acide et mono amine	88
Figure.V.6.b. Taux d'avancement de la consommation des acides aminés di acides et leur amides	88
Figure.V.6.c. Taux d'avancement de la consommation des acides aminés di aminés et de la proline	89

Figure.V.6.d. Taux d'avancement de la consommation des acides aminés aromatiques et soufrés	89
Figure. V.7. Comparaison des évolutions de pH expérimental et simulé. Fermentation sur milieu MS_AA : cas de l'hypothèse 2.	92
Figure. V.8. Comparaison des évolutions de pH expérimental et simulé. Fermentation sur milieu MS_AA : cas de l'hypothèse 3.	95
Figure.V.9. Evolution de l'éthanol, de la biomasse, du dioxyde de carbone, de l'ammonium, de l'azote alpha aminé et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_300.	96
Figure.V.10. Evolution de l'acide malique, de l'acide citrique, de l'acide lactique, de l'acide succinique, de l'acide acétique et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_300.	96
Figure V.11. Evolution du pH au cours d'une fermentation alcoolique sur différentes sources azotées. (▲) acides aminés ; (▪) ions ammonium ; (X) acides aminés + ions ammonium. D'après M.J. Torija et coll. (2003) Manque 1 courbe.	98
Figure. V.12. Comparaison des évolutions de pH expérimental et simulé. Fermentation sur milieu MS300.	100
Figure.V.13. Evolution des sucres totaux, de l'éthanol, de la biomasse, du dioxyde de carbone, de l'ammonium, de l'azote alpha aminé et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MR.	101
Figure.V.14. Evolution du glycérol, de l'acide malique, de l'acide citrique, de l'acide succinique, de l'acide acétique et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MR.	101
Figure. V.15. Comparaison des cinétiques du pH expérimental et simulé. Fermentation sur milieu MR.	105

LISTE DE TABLEAUX

Tableau II.1. Produits secondaires formés par <i>S. cerevisiae</i> à différents pH du moût.	6
Tableau II.2. Fractions azotées de moûts de raisins.	14
Tableau II.3. Composition moyenne en acides aminés de moûts Australiens (d'après Gockowiak et Henschke)	15
Tableau II.4. les 20 Acides aminés essentiels	16
Tableau II.5. Récapitulatif des systèmes de transport des acides aminés chez <i>saccharomyces cerevisiae</i> . Le nombre de protons échangés par types de transporteurs est aussi indiqué.	31
Tableau III.1. Composition du milieu Levain	34
Tableau III.2. Composition du milieu de pré-levain	34
Tableau III.3. Composition du milieu Levain	35
Tableau III.4. Composition du milieu synthétique de base.	36
Tableau III.5. Composition en matière azotée des milieux synthétiques	36
Tableau III.6. Composition du moût de raisins blancs fournie par SOPAGLY	37
Tableau III.7. Tampons de citrate de lithium (www.biochrom.uk) utilisés dans le dosage des acides aminés au Biochrom 30	46
Tableau IV.1. Evolution du pH en fonction de la concentration en ions ammonium du moût de raisins blancs. Test réalisé à 20°C. (pH précision : $\pm 0,05$).	53
Tableau IV.2. Liste des 20 acides aminés représentés dans le code génétique avec leur pK dans une solution aqueuse. (Jukes T.H. et Schmidt L.A. (1934))	56
Tableau IV.3. Paramètres de calcul de coefficients de dissociation d'acides organiques. T=20°C in water-ethanol solution, ** T=25°C in water (Usseglio-Tomasset and Bosia, 1978)	69
Tableau IV.4. Variables intervenant dans le modèle de calcul du pH.	72
Tableau IV.5 : système d'équations à résoudre. Les fonctions $m_i(m_{H^+}, I)$ sont consignées dans le tableau IV.4.	75
Tableau IV.6. Comparaison pH expérimentaux et calculés de différents milieux synthétiques	77
Tableau IV.7. Comparaison du pH expérimental et simulé par le modèle en fonction de la concentration en éthanol	78
Tableau IV.8. Comparaison du pH expérimental et simulé par le modèle en fonction de la concentration en acide succinique à 0 et à 12% d'éthanol.	79
Tableau V.1. Quantité d'azote assimilable apportée par chacun des acides aminés dans le milieu MS_AA.	90
Tableau V.2. Proportions des acides aminés suivant leur charge dans le milieu MS_AA initial au pH de 3,23	93
Tableau V.3. Concentration d'acides aminés en fonctions de leur charge.	94
Tableau V.4. Proportions d'acides aminés en fonctions de leur charge dans le milieu MS300 ; pH initial égal à 3,42.	99
Tableau V.5. Comparaison des proportions d'acides aminés selon le milieu.	103
Tableau V.6. Proportions d'acides aminés en fonctions de leur charge dans le milieu MR; pH initial égale à 3,32.	104

I. Introduction

Dans un marché mondial de commercialisation des vins de plus en plus concurrentiel, la tendance actuelle pour les producteurs est d'augmenter leur compétitivité en limitant les pertes, en produisant le plus rapidement possible des vins aux caractéristiques répondant à un cahier des charges précis. Dans cet objectif, améliorer la maîtrise du procédé de fabrication est devenue obligatoire pour les producteurs. Ainsi, depuis quelques décennies, de nombreuses études sont menées sur le processus fermentaire dans le domaine oenologique. Effectuée pendant des siècles de façon empirique, la fermentation alcoolique lors de l'élaboration du vin reste encore aujourd'hui mal maîtrisée.

Cette étape de fermentation alcoolique est complexe car elle fait intervenir de nombreux processus biologiques, chimiques, physiques qui entraînent une évolution continue de la composition et des propriétés physico-chimiques du milieu. Le potentiel d'hydrogène (pH) est une des variables utilisées pour caractériser ces propriétés des milieux. Relativement facile à mesurer, le pH est utilisé dans de nombreux domaines comme variable opératoire, caractérisation du produit fini ou encore à des fins de contrôle qualité. De nombreuses études se sont attachées à corréler sa valeur à des lois cinétiques de réactions, des qualités organoleptiques de produits ou encore des activités enzymatiques.

En œnologie, l'influence du pH est bien connue sur quelques aspects. Citons :

- La contamination des moûts de raisins et vins par des microorganismes indésirables (bactéries, levures *Brettanomyces*) est facilitée par des valeurs élevées de pH (au-delà de pH = 4).
- L'efficacité du sulfitage pour éviter ces contaminations est également conditionnée par la valeur du pH. Plus le pH est bas, plus l'action du dioxyde de soufre ajouté est efficace.
- L'acidité du vin constitue une de ses caractéristiques de base, tant sur le plan analytique que sensoriel. Elle conditionne le déroulement de la fermentation malo-lactique (FML), la conservation du vin, le pouvoir antiseptique de l'anhydride sulfureux, la clarification du vin. Même si l'on ne peut pas corréler totalement pH et acidité perçue à la dégustation, la connaissance du pH donne tout de même des informations sur les propriétés organoleptiques du vin.

Tout au long de la chaîne d'élaboration, les paramètres acidité totale et pH sont les indicateurs de « l'état de santé » du produit et de son équilibre.

Cependant, la valeur du pH d'un moût et son évolution au cours de la fermentation alcoolique est mal connue et surtout mal expliquée. S'il est généralement admis que le pH

d'un vin se situe généralement entre 3 et 4 suivant les vins et les conditions de fermentations, peu d'études se sont consacrées à sa variation en cours de procédé. C'est à cette problématique que nous nous intéresserons dans ce travail. Afin de restreindre la difficulté du problème, nous nous sommes limités dans un premier temps à des fermentations alcooliques de moûts de raisins pour vins blancs dont la technologie est plus simple que pour la vinification en rouge. En blanc la fermentation se fait en phase liquide homogène alors qu'en rouge, elle est hétérogène (liquide/solide).. Les principales questions qui se sont posées à nous au début de cette étude et auxquelles nous tenterons de répondre dans ce manuscrit sont :

- Quelle est l'importance des variations de pH au cours des fermentations alcooliques ?
- Quelle est qualitativement son évolution ?
- Est-il possible d'expliquer cette évolution ? Quels sont les phénomènes physiques, chimiques et biologiques responsables de ces variations ?
- Enfin, peut-on quantitativement relier ces phénomènes aux valeurs de pH obtenues ? Peut-on alors proposer un modèle mathématique calculant l'évolution du pH en cours de fermentation ?

Afin de répondre à ces questions, des fermentations en moûts synthétiques et sur moûts de raisins seront réalisées. Simultanément à la réalisation de ces expériences, un modèle mathématique de prédiction du pH et de son évolution à partir de la composition initiale du moût sera établi. L'intérêt majeur de construire un tel modèle est d'obliger à formuler des hypothèses pour expliquer les phénomènes mis en évidence de façon expérimentale et de pouvoir ensuite les tester. Certaines hypothèses sur l'effet de phénomènes physiques ou biologiques sur l'évolution du pH pourront être confrontées aux résultats du modèle ce qui permettra de les valider ou non. L'objectif du modèle mathématique que nous nous proposons d'établir est donc, dans un premier temps, de capitaliser la connaissance acquise durant les expérimentations. Dans un second temps, une utilisation de ce modèle pourrait être une aide à la conduite de la fermentation pour les œnologues. Réaliser un suivi en ligne de la fermentation par la mesure du pH ou la prédiction de la valeur finale de pH suivant les teneurs initiales du moût en certains composés peuvent être par exemple intéressants pour l'œnologue.

Dans ce manuscrit, nous présenterons tout d'abord dans la partie bibliographie les principaux constituants des moûts de raisins afin d'identifier ceux pouvant influencer le pH. Les mécanismes d'incorporation et d'assimilation des sources azotées qui semblent jouer un

rôle majeur sur l'évolution du pH seront ensuite détaillés. Une partie 'matériels et méthodes' présentera les protocoles expérimentaux mis en place pour la réalisation des expériences de fermentations et les méthodes utilisées pour les analyses associées. Nous présenterons ensuite le modèle mathématique mis en place pour le calcul du pH ainsi que les tests de validation. Pour finir, ce modèle sera confronté à des données expérimentales de fermentations alcooliques sur différents milieux synthétiques et sur un moût de raisins pour vins blancs. Ces confrontations permettront de discuter différentes hypothèses sur les raisons de l'évolution du pH durant les fermentations. Nous terminerons classiquement en rappelant les principales conclusions de notre étude et en envisageant les perspectives possibles au développement de ce travail.

II. Eude bibliographique

II.1. Acidité et pH des moûts et des vins

Un des facteurs de la qualité gustative d'un vin est son acidité ou plutôt sa perception acide. Le vin contient un nombre important d'acides organiques divers, chacun d'eux contribuant à l'acidité titrable et au pH mais chacun ayant aussi une saveur propre. Par exemple la saveur très verte de l'acide malique est différente de la saveur aigrelette de l'acide lactique. Dans la pratique, comme il est difficile de doser séparément chacun des acides présents dans le moût ou le vin, on utilise les notions :

- d'acidité totale : définie comme « la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH à 7 par addition d'une solution alcaline titrée ». Elle est généralement exprimée en g.L^{-1} d'acide sulfurique.
- d'acidité volatile : « constituée par les acides appartenant à la série acétique et se trouvant dans le vin à l'état libre ou salifié ». Elle est exprimée également en g.L^{-1} d'acide sulfurique.
- d'acidité fixe : définie comme « la différence entre acidité totale et acidité volatile ».
- de pH : cologarithme de l'activité des ions H^+ .

Globalement une acidité totale forte correspond à une valeur basse du pH, mais les variations respectives de l'une et de l'autre ne sont pas strictement proportionnelles.

Le pH des moûts et vins est compris généralement entre 3 et 4. Pour les moûts il varie selon la région, le cépage, l'état de maturité et les conditions climatiques. L'acidité totale des moûts à maturité se place dans une fourchette de 3 à 12 g.L^{-1} (H_2SO_4). Elle est généralement plus forte pour les moûts blancs que pour les rouges, et pour les moûts issus de régions froides que pour ceux issus de régions chaudes. Il semble que depuis quelques années les niveaux d'acidité des moûts (et des vins) aient significativement diminué. Ainsi, d'après Blouin (2001) en Languedoc Roussillon le pH moyen des moûts est passé de 3,4 en 1984 à 3,6 en 1990 alors que l'acidité totale passait de 4,2 à 3,45 g.L^{-1} . En bordelais, le même auteur signale un passage de valeurs de 3,4 à 3,8 pour les moûts blancs entre 1989 et 1993 (l'acidité variant de 4,75 à 3,6 g.L^{-1}). Pour les rouges, dans le même temps le pH passait de 3,6 à 3,7 alors que l'acidité totale restait stable (3,5 g.L^{-1}).

Lors de la vinification, l'acidité totale diminue globalement en particulier en raison de la cristallisation de l'acide tartrique pour les blancs comme pour les rouges et de la fermentation malo-lactique pour les rouges et certains blancs. Cependant la cinétique de l'évolution de cette acidité comme celle du pH a été peu analysée. Seules les études successives de Gerbaud (1996) et de Devatine (2002) aboutissant au logiciel Mextar ont apporté une possibilité de prévision de l'évolution de l'acidité dans la phase post fermentaire.

Compte tenu du rôle essentiel que jouent le pH et l'acidité sur différents aspects de la vinification comme de l'impossibilité de corriger ses valeurs avant la récolte, il a été très tôt envisagé la possibilité de les modifier au moment de la récolte. A l'heure actuelle, la correction de l'acidité relève d'une réglementation très précise (mais variable selon les pays) qui codifie le droit à la correction et les façons de la réaliser.

Le pH exerce tout d'abord une action sélective sur la microflore susceptible de se développer dans le milieu. Le pH acide du moût (et le taux d'alcool pour le vin) protège ce dernier du développement de toute flore pathogène, sans pour autant inhiber l'activité des levures. En effet bien que leur pH optimum d'activité se situe vers des valeurs de pH de 5 à 6, les valeurs usuelles de pH du moût ne sont pas inhibitrices. Des difficultés fermentaires n'ont été signalées que lorsque les valeurs de pH deviennent inférieures à 2,8-2,9.

Généralement chez les eucaryotes, le maintien du pH intracellulaire est fonction de la variation du pH initial extracellulaire (Gillies et Deamer, 1979). Dans les conditions de fermentation, lorsque le pH initial est de 3,0 le pH intracellulaire se situe entre 5,5 et 5,75. Quand le pH initial est supérieur à 6, le pH intracellulaire est alors entre 5,9 et 6,75 (Imai et Ohno, 1995). Pour maintenir le pH intracellulaire dans les conditions physiologiques optimales pour le métabolisme, une excrétion de protons s'ensuit. Toute l'énergie est donc concentrée à cette tâche pour la survie cellulaire limitant souvent la croissance cellulaire. On peut, dès lors, parler de phénomène d'inhibition par le pH. Cette inhibition intervient le plus souvent quand le pH initial du moût de fermentation est très bas. Selon Thomas et coll. (2002), la diminution du pH entraîne une augmentation de la concentration en acides indissociés. De même, ces auteurs soulignent qu'étant donné que l'accumulation d'acides organiques est une fonction de la différence de pH entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, une importante inhibition surviendrait à pH très acide (pH inférieur à 3). Pour Torija et coll. (Torija et coll., 2003) le pH initial de fermentation induit la valeur du pH final et surtout la vitesse de consommation du substrat carboné : les pH bas ralentissant la consommation du sucre et réduisant par conséquent la productivité. Aussi, selon Dubois et

Grenson (1979) et Gregory et coll. (1982) le pH optimal de diverses perméases est supérieur au pH des moûts et ainsi, aux faibles valeurs de pH, le transport actif de l'azote serait affecté.

Il apparaît aussi que selon la valeur du pH dans des gammes qui dépassent largement le domaine œnologique, les produits formés par la levure (*S. cerevisiae*) lors de la fermentation alcoolique puissent voir leurs quantités varier comme le montre les valeurs rapportées par Usseglio-Tomasset (1995) (Tableau II.1).

Tableau II.1. Produits secondaires formés par *S. cerevisiae* à différents pH du moût.

Produits (mmoles/L)	pH				
	3,0	5,0	5,8	7,0	8,0
Glycérol	84	80	112	169	209
Ac. Acétique	17	16,5	32	53	80,5
Ac. Succinique	6,3	6,3	5,6	9,3	10,1
Acétoïne	1,0	0,8	0,7	0,5	0,5
2,3 butanediol	7,2	7,2	6,3	4,8	4,1
Ethanal	1,0	1,1	1,3	1,0	1,0

En ce qui concerne la fermentation malo-lactique (transformation de l'acide malique en acide lactique), il est généralement admis que les bactéries lactiques sont plus sensibles que les levures à l'acidité du milieu et un pH en fin de fermentation alcoolique trop bas, inférieur à 3,2 peut bloquer le déroulement de cette fermentation. Cela nécessite, dès lors, une sélection de souches résistantes à faible pH. C'est le cas d'*Oenococcus oeni* qui semble la souche la plus adaptée aux pH bas (Zhang et Lovitt, 2005).

Les levures *Schizosaccharomyces* capables de transformer l'acide malique en éthanol sont par contre encore actives à ces pH très bas.

Mais un des rôles œnologiques majeurs du pH réside dans son action sur les équilibres entre les différentes formes du SO₂. En effet lors de son apport dans le moût (ou le vin) une partie du SO₂ se combine à divers constituants du milieu (aldéhydes, sucres, acides cétoniques et uroniques,...) l'autre partie restant sous forme dite « libre ». Dans cette partie libre, seule une faible fraction (1 à 10%) dite « active » ou « moléculaire » aura un réel effet sur les microorganismes. Les équilibres entre ces différentes fractions sont sous la dépendance du pH et de la température. Plus le pH est acide, plus la fraction « moléculaire » augmente. A titre d'exemple, pour un même vin ayant reçu une quantité identique de SO₂, la part moléculaire varie de 1,0 mg.L⁻¹ à pH=3,8 à 9,3 mg.L⁻¹ à pH = 2,8.

Enfin, il faut aussi prendre en compte le rôle joué par l'acidité (ou le pH) lors de la dégustation. Une acidité élevée donne de la fraîcheur aux vins blancs et rosés et peut masquer un manque de charpente dans les vins rouges. Blouin (2001) signale que pour les vins rouges de Bordeaux (millésimes allant de 1941 à 1997) la note qualitative est corrélée à l'acidité : plus l'acidité totale est faible (dans une gamme allant de 7 à 3,5 g.L⁻¹) plus la note qualitative est élevée. D'une manière plus générale, le pH intervient sur les différentes réactions qui marquent les propriétés du vin comme sa résistance à l'oxydation, ses caractéristiques chromatique, sa stabilité protéique ou microbienne...

Au cours de la fermentation alcoolique, le pH du moût est en perpétuel changement. Les acides organiques consommés ou produits subissent des dissociations et libèrent des ions hydrogènes dans le milieu de fermentation influençant ainsi le pH. Tous les ions hydrogène ne proviennent, cependant, pas de la dissociation des acides organiques. Certains proviennent de l'assimilation de la source azotée notamment des ions ammonium et probablement des acides aminés qui pourraient contribuer à la chute du pH par assimilation des acides aminés de charge positive.

L'alcool qui est le principal produit de la fermentation participe également à la variation du pH. Il agit sur les constantes de dissociation des acides organiques, sur la masse volumique et la constante diélectrique du solvant et donc indirectement sur le pH. Notons cependant qu'à notre connaissance aucune littérature ne mentionne cette influence au cours de la fermentation alcoolique.

Enfin, les précipitations tartriques qui ont lieu pendant la vinification ont une incidence sur le pH du vin.

De ce qui précède, l'on peut dire sans exagération, que le pH est un paramètre prépondérant de la vie du vin.

Les moûts et vins sont des solutions complexes formées de plusieurs composés. Quels sont donc ces composés ?

II.2. Les principaux constituants des moûts et des vins

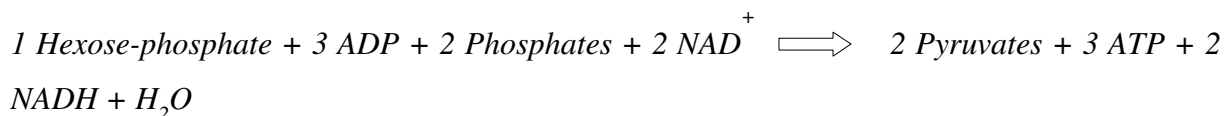
II.2.1. Les sucres du moût et leur utilisation.

Le jus de raisin mûr contient de 15 à 25 % de glucides : glucose et fructose (sucres en C6) pour 99%, les 1% restant étant des sucres en C5 (le xylose et l'arabinose). Au cours de la maturation du raisin, la proportion de fructose augmente et à maturité, le rapport glucose/fructose est proche de 0,95. Les vins restés sucrés après une fermentation partielle, que l'arrêt de la fermentation soit spontané ou qu'ils se trouvent mutés par addition d'alcool, comme les " vins doux naturels ", ou d'anhydride sulfureux, comme les vins liquoreux, contiennent encore ces deux sucres, dans des proportions différentes de celles du moût initial. En effet, lors de la fermentation, les levures de vin vont fermenter plus activement le glucose que le fructose.

La première étape de la fermentation alcoolique, une fois effectuée l'entrée du glucose ou du fructose dans la cellule, est la phosphorylation du sucre. Cette étape est très rapide et si efficace qu'il est impossible de doser du fructose ou du glucose libre dans la cellule à des concentrations supérieures à 70 mg.L⁻¹ de cytoplasme même lors de fermentation sur des milieux contenant des concentrations en sucres supérieures à 200 mg.L⁻¹ (Becker et Betz, 1972). Cette étape de phosphorylation repose en conditions oenologiques sur l'intervention certaine de deux enzymes (Hexokinase PII et Glucokinase) (Maitra, 1970) alors que l'intervention réelle de la troisième enzyme (Hexokinase PI) reste discutée (Gancedo et coll., 1977; Jimenez-Flores et coll., 1990). Les deux enzymes hexokinases PI et PII sont capables de phosphoryler le glucose et le fructose, mais avec des rendements différents (ratio 3:1 en faveur du glucose), tandis que l'enzyme glucokinase ne phosphoryle exclusivement que le glucose. Ces différences expliquent pourquoi le glucose est consommé à une vitesse plus importante que le fructose au cours de la fermentation, et qu'en conséquence, en fin de fermentation, la concentration relative de fructose est plus élevée que celle du glucose (D'Amore coll., 1989). Les différences dans les mécanismes de transport peuvent également expliquer ce phénomène.

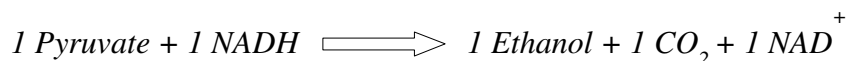
La suite du métabolisme des sucres repose sur la transformation des sucres-phosphates en pyruvate par la voie classique de la glycolyse. Les hexoses-phosphates (Fructose 6-phosphate et Glucose 6-phosphate) sont des molécules importantes reliées à d'autres métabolismes secondaires, notamment à celui des polysaccharides, molécules intervenant dans la synthèse

de la paroi levurienne. L'ensemble de la glycolyse conduit à la formation de deux molécules de pyruvate par molécule de sucre métabolisée suivant les réactions globales suivantes:



Si de nombreuses enzymes de cette voie se sont révélées des enzymes-clefs du métabolisme chez *Saccharomyces cerevisiae* (notamment du fait de leur mode de régulation), il apparaît toutefois que leur surproduction par des méthodes de génie génétique n'affecte en rien ni le niveau des métabolites de la voie elle-même, ni la vitesse de production d'éthanol (Schaaf coll., 1989; Van de Aar coll., 1990). Il semblerait donc que la glycolyse ne constitue pas une étape limitante du métabolisme en fermentation alcoolique.

En anaérobiose, le pyruvate est principalement orienté vers la production d'éthanol de façon à régénérer le cofacteur NAD^+ consommé au niveau du glycéraldéhyde 3-phosphate. Le pyruvate est donc décarboxylé en acétaldéhyde par l'enzyme pyruvate décarboxylase, puis l'acétaldéhyde est réduit en éthanol par l'intermédiaire de l'enzyme alcool déshydrogénase. C'est à ce stade qu'une molécule de NAD^+ est produite, suivant la réaction suivante:



Le bilan global de la fermentation alcoolique est donc le suivant:



Toutefois, ce bilan n'est que théorique et au cours de la fermentation alcoolique, il y a synthèse de biomasse et de divers produits dont le glycérol et des acides organiques. Bien que la production d'acides organiques reste faible au regard de la quantité de sucres transformés en éthanol et gaz carbonique, son effet sur le pH doit être envisagé.

II.2.2. Les acides organiques

Ce sont des éléments essentiels de la constitution des moûts et des vins, de leurs qualités et de leurs défauts éventuels. Leur nature et leur concentration règlent les équilibres acide-base et, de ce fait, commandent le goût acide du vin. La majeure partie des acides organiques présents

dans les vins provient du jus de raisins, le reste provenant de l'activité des microorganismes (levures et bactéries).

II.2.2.1. Acides organiques des moûts

- l'acide tartrique

L'acide tartrique ($\text{COOH-CHOH-CHOH-COOH}$) présent dans le vin est l'isomère droit (acide L + tartrique). Cet acide spécifique du raisin et du vin (on le trouve très peu dans la nature en dehors de la vigne) est le plus important des acides fixes du vin ; il est le plus fort, le plus dissocié, celui qui, à teneur égale, élève le plus la concentration des ions H^+ . Le pH du moût et du vin dépendent pour beaucoup de l'acide tartrique. Des trois acides du vin, il est le plus résistant à la dégradation par les microorganismes (levures ou bactéries). Lors de la vinification, sa concentration diminue par précipitation sous forme de bitartrate de potassium au cours de la fermentation puis sous l'action du froid, et ensuite plus lentement par précipitation de tartrate neutre de calcium. Accidentellement, l'acide tartrique peut être attaqué par certaines bactéries lactiques, qui le décompose avec formation d'acide lactique et augmentation d'acide volatile : c'est la maladie de la tourne. En cas d'une trop forte acidité de la vendange l'acide tartrique peut être éliminé partiellement du moût. Enfin, avant la mise en bouteille il est d'usage d'assurer la stabilité du vin par un traitement par le froid (ou par électrodialyse) qui favorise la cristallisation de cet acide.

- L'acide malique

L'acide malique ($\text{COOH-CH}_2\text{-CHOH-COOH}$) présent dans le vin est l'isomère gauche (acide L-malique). En terme de concentration, c'est le deuxième acide des moûts après l'acide tartrique. Cet acide organique, très répandu dans le règne végétal, est l'acide principal de beaucoup de fruits. Sa saveur marquée en fait un élément majeur dans l'appréciation sensorielle d'un vin : la verdeur des vins de certaines années dont l'été a été froid, le caractère sévère des vins jeunes sont dus à l'acide malique. Lors de la vinification, sa concentration peut diminuer du fait d'une consommation partielle possible par les levures de la fermentation alcoolique ou totale par les bactéries lactiques de la fermentation malolactique.

- L'acide citrique

L'acide citrique existe dans les raisins de tout cépage et en plus grande quantité dans les moûts concentrés par la pourriture ou le passerillage des raisins. Les teneurs en acide citrique des vins sont très variables. Beaucoup de vins rouges en sont dépourvus. En effet parallèlement à la fermentation malolactique qu'elles provoquent, beaucoup de bactéries lactiques fermentent l'acide citrique, en donnant lieu surtout à la formation d'acide acétique. L'acide citrique possède à un haut degré la propriété d'engager le fer ferrique dans un anion complexe double. Pour cette raison, il est utilisé de façon courante dans le traitement de la casse ferrique. On l'utilise encore pour remonter l'acidité fixe et ainsi améliorer l'acidité gustative d'un vin surtout dans les vins blancs secs. Son emploi dans les vins rouges appelle quelques réticences, car il n'est pas très stable et risque d'être fermenté par bactéries lactiques avec augmentation d'acidité volatile.

A côté de ces principaux acides organiques pris en compte dans la suite de l'étude, il y en a également d'autres moins importants quantitativement provenant des jus de raisins. Nous renvoyons le lecteur à l'ouvrage de Taillandier et Bonnet (2006) pour une liste exhaustive.

Cependant, les acides organiques présents dans les vins ne sont pas tous issus des raisins. Une minorité en terme de concentration provient des fermentations.

II.2.2.2. Acides organiques issus de la fermentation alcoolique.

Au cours de la fermentation, la consommation du sucre par la levure (glycolyse) conduit à la formation d'acides organiques typiques de la fermentation. Les plus importants sont :

- **L'acide succinique**

L'acide succinique est issu de la fermentation alcoolique du sucre. Sa production reste tout de même faible. Elle est d'environ 1 g pour 100 g d'alcool.

- **L'acide lactique**

Pendant la fermentation alcoolique, à partir des sucres, les levures peuvent synthétiser une faible quantité d'acide lactique, en majorité de l'acide D(-) lactique et moins de 10% de l'acide

L(+) lactique. Mais l'essentiel est issu de la fermentation malolactique, et c'est alors l'isomère L(+) qui est en majorité (~75%).

- L'acide acétique

L'acide acétique est également un produit de la fermentation alcoolique du sucre. C'est un acide volatile. Sa production reste faible et inférieure à 1 g.L^{-1} , bien que des niveaux supérieurs aux doses autorisées par les règlements d'appellation soient facilement atteints. Des teneurs plus élevées peuvent apparaître dans le cas de vinifications spéciales (blancs liquoreux) ou surtout en cas d'attaque bactérienne (bactéries lactiques à partir des sucres ou bactéries acétiques à partir de l'alcool).

Il y a également l'acide citramalique, l'acide diméthylglycérique etc.... qui sont moins importants en quantité que les précédents.

II.2.3. Alcools : éthanol

L'éthanol communément appelé alcool, est le composé majoritaire produit par les levures *Saccharomyces cerevisiae* à partir des sucres en C_6 au cours de la fermentation alcoolique. La glycolyse suivie de la décarboxylation de l'acide pyruvique et de la réduction de l'éthanal entraîne sa production. Le rendement éthanol-sucre est d'environ $16,5 \text{ g/1\%}$ de volume d'alcool. L'éthanol représente 7 à 16 % du volume total du vin. Il peut influencer plusieurs paramètres : le pH, la qualité du vin, la conservation et la valeur marchande. La teneur en alcool du vin dépend de la concentration initiale en sucre du moût et pour une même valeur initiale des conditions de fermentation qui peuvent faire varier légèrement le rendement de la conversion. Bien entendu ce rendement n'atteint jamais la valeur limite dite de Gay Lussac de $0,511 \text{ g.g sucre}^{-1}$. Il s'établit en général à $0,45 - 0,48 \text{ g.g sucre}^{-1}$, ce qui correspond à la règle classique des œnologues des 16,5 à 17g de sucre nécessaire à synthétiser 1% vol/vol d'éthanol.

Il existe aussi d'autres types d'alcools dans le vin mais en faible quantité. Ce sont le méthanol issu de la déméthylation des pectines du raisin et les alcools supérieurs produits par l'activité des levures lors de la fermentation alcoolique.

Au cours de la fermentation alcoolique, on note également la production d'alcools supérieurs qui participent à la complexité aromatique du vin (alcools amyliques, hexanol, 2-phényl-éthanol,...)

II.2.4. Polyalcools : glycérol

Après l'eau et l'alcool, le glycérol est le constituant du vin le plus abondant. Par sa saveur sucrée, égale à celle du glucose, le glycérol contribue pour une modeste part au moelleux du vin perçu avec les premières impressions gustatives. Le glycérol est formé au début de la fermentation alcoolique du moût : les premiers 50 g.L⁻¹ de sucre fermenté donnent plus de la moitié de la teneur en glycérol du vin. Sa formation dépend de la quantité initiale de sucre, de la nature des levures et des conditions de fermentation : température, acidité, aération, sulfitage. Sa proportion est relativement constante : elle varie de 6 à 10 g pour 100 g d'alcool, ce qui représente 1/10 à 1/15 du poids de l'alcool. Cependant dans les vins blancs liquoreux provenant de raisins pourris nobles, les teneurs en glycérol dépassent souvent de beaucoup ces concentrations.

D'autres polyalcools sont présents dans le vin mais à des niveaux de concentration très faibles ; citons par exemple l'inositol, le mannitol, le butanediol etc....

II.3. Les substances azotées du moût et leur utilisation par la levure.

Les composés azotés sont essentiels pour la croissance et le métabolisme de la levure et l'azote constitue quantitativement le second nutriment nécessaire à la levure. La fraction azotée du moût est complexe et variable : ion ammonium, acides aminés, peptides et protéines. Elle détermine en partie la cinétique de la fermentation et l'élaboration de l'arôme et des sous-produits. Si l'effet de l'azote a été longtemps sous estimé, en dépit de travaux de quelques précurseurs comme Castro (1953), Cantarelli (1957) et Ough (1964), actuellement le problème de la nutrition azotée de la levure, très lié à celui des arrêts de fermentation, est un sujet majeur dans le monde œnologique.

Ainsi, il semble essentiel d'établir l'importance quantitative et qualitative de l'azote sur les cinétiques fermentaires, les réactions métaboliques impliquées et surtout sur l'état ionique du moût au cours de la fermentation.

II.3.1. Les différentes formes d'azote

De manière générale, le moût de raisin contient une grande variété de composés azotés susceptibles d'être assimilés par la levure : ions ammonium libre (NH₄⁺), acides aminés

libres, peptides et petits polypeptides. La variabilité qualitative et quantitative de ces sources d'azote dans le moût dépend grandement de facteurs vinicoles : la concentration en azote total peut ainsi varier de 60 à 2400 mg.L⁻¹, la concentration en ions NH₄⁺ pouvant varier de 19 à 240 mg.L⁻¹ (Henscke et Jiranek, 1992). Le tableau II.2 recense quelques valeurs relevées dans la littérature.

Tableau II.2. Fractions azotées de moûts de raisins.

Azote									
Concentration dans le jus de raisin (mg/L)									
Ref. bibliographique	a1		2		3		4		5
Ammonium	10-120	(2)	45-99	(6)	45-89	(4)	7-127	(15)	0-146 (25)
Acide aminé	170-1120 ^b	(2)	101-168	(6)	704-1070 ^c	(4)	19-144	(15)	-
Amine	-		-		46-81	(4)	14-176	(15)	15-182 (25)
Amide ^d	10-40	(2)	-		-		-		-
Humine ^e	5-20	(2)	-		-		-		-
Polypeptide	-		-		-		10-70	(15)	38-132 (25)
Hexosamine	-		-		-		-		18-29 (25)
Protéine	10-100	(2)	-		-		-		28-97 (25)
Residuel	100-200	(2)	-		-		-		-
Total	305-1600	(2)	358-570	(6)	322-490	(4)	98-618	(15)	98-1130 (25)

Les nombres en parenthèse indiquent le nombre d'échantillons analysés.

^aRéférences : (1) Hening, 1945 cité par Koch et Sajak, 1959 ; (2) Lafon-Lafourcade et Peynaud, 1959 ; (3) Lafon-Lafourcade et Guimberteau, 1962 ; (4) Bizeau, 1963 ; (5) Cordonnier, 1966, ^bDipeptides inclus, ^cArginine, proline, sérine et thréonine, ^dAsparagine et glutamine, ^eTryptophane et tyrosine

II.3.1.1. Les ions ammonium

La concentration en ion ammonium dépend de la nature du cépage, des conditions culturales et climatiques et varie dans une gamme de 20 à 250 mg.L⁻¹. Par exemple, les raisins Californiens en contiennent entre 19 et 240 mg N.L⁻¹ (Ough, 1969) ; les variétés Stellenbosch en contiennent entre 43 et 115 mg N.L⁻¹ (Ough et Kriel, 1985) ; entre 17 et 156 mg N.L⁻¹ dans les jus de raisins de la région du Languedoc Roussillon (Bely, Sablayrolles et Barre, 1991) ; entre 21 et 241 mg N.L⁻¹ dans les moûts australiens (Gockowiak et Henschke, unpublished data).

II.3.1.2. Les acides aminés

La teneur et la composition des moûts de raisins en acides aminés dépendent également de la nature du cépage, des conditions culturales et climatiques comme le montrent les tableaux ci dessous. Pour des moûts du Languedoc Roussillon, Bely et coll., (1991) font état de valeurs allant de 28 à 336 mg N.L⁻¹ avec une moyenne de 120 mg N.L⁻¹.

Tableau II.3. Composition moyenne en acides aminés de moûts Australiens
(d'après Gockowiak et Henschke)

Amino acid	Cabernet sauvignon	Chardonnay	Pinot noir	Riesling	Shiraz	Sauvignon blanc	Traminer	Moyenne
Alanine	106	181	100	78	257	64	106	124
γ-Amino butyrate	113	87	69	98	105	86	76	87
Arginine	279	314	351	211	591	298	536	320
Asparagine	5	11	2	1	6	3	7	6
Aspartate	23	34	32	52	36	27	34	37
Citruline	1	3	2	1	32	3	2	3
Glutamate	43	83	55	67	91	71	71	71
Glutamine	45	149	54	48	181	92	169	100
Glycine	1	5	1	1	1	3	2	3
Histidine	7	15	7	13	37	20	23	15
Isoleucine	14	18	17	18	15	21	12	17
Leucine	23	18	16	16	19	27	18	18
Lysine	2	2	3	7	3	5	5	4
Méthionine	1	4	2	5	2	5	4	4
Ornithine	1	3	2	7	2	3	3	4
Phénylalanine	10	18	5	8	17	16	10	12
Sérine	38	100	42	61	45	39	48	65
Thréonine	42	73	68	69	74	61	95	70
Tryptophane	1	6	5	6	5	9	11	6
Tyrosine	2	6	2	3	24	14	5	6
Valine	26	28	20	21	38	30	22	25
Total (mg/L)	782	1157	857	789	1581	897	1259	199
(mg N/L)	159	222	182	146	339	179	279	199

Parmi les acides aminés une vingtaine sont dits essentiels car indispensables à la croissance des organismes notamment la levure. Le tableau II.4 présente les formules chimiques des acides aminés.

Les travaux de Yokotsuka et Fukui (2002) vont dans le même sens. Ils ont pu observer que la composition totale du moût de raisins en acides aminés diffère selon le type du cépage et de l'année. Les analyses effectuées sur des moûts de 1995 ont montré que le cabernet sauvignon contenait 1283 mg.L⁻¹ d'acides aminés totaux. Le muscat bailly A en contenait 1660 mg.L⁻¹. Dans le riesling, ils ont obtenu une concentration en acides aminés totaux de 443 mg.L⁻¹. Quant au chardonnay, ils ont noté une concentration en acides aminés totaux de 1995 mg.L⁻¹.

Tableau II. 4. Les 20 Acides aminés essentiels. (<http://svtfm.chez-alice.fr/Premiere/Partie1/Chapitre1/documents/07aa.pdf>)

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ glycine	
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ valine	$\text{HOH}_2\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ sérine
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ leucine	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ phénylalanine
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ isoleucine	$\text{H}_3\text{C}-\text{CHOH}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ thréonine
$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ cystéine	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ tryptophane
$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ acide aspartique	$\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ histidine
$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ méthionine	$\text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ acide glutamique
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}=\text{C} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH} \end{array}$ arginine	$\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ asparagine
$\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ tyrosine	$\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ glutamine
$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ proline	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ lysine
	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$ alanine

II.3.1.3. Les peptides et polypeptides (protéines)

En raison des difficultés analytiques, peu de données fiables sont disponibles sur la teneur en peptides et en protéines des moûts de raisins (Waters, 1991). L'apport d'azote par les polypeptides estimée entre 1 et 13,1 % de l'azote total selon les auteurs (Koch et Sajak

(1959), Cordonnier (1966), Tarantola (1970), Anelli (1977), Amerine et coll. (1980) et Correa et coll. (1988)).

II.3.2. Métabolisme des acides aminés

L'essentiel de l'alimentation azotée de la levure est fourni, dans le moût de raisin, par l'ion ammonium et les acides aminés. La levure peut synthétiser la plupart des acides aminés nécessaires à l'édification de ses protéines par fixation de l'ion ammonium sur un squelette carboné issu de la dégradation des sucres. Les voies réactionnelles empruntées, dans lesquelles la glutamine et le glutamate jouent un rôle important, sont les mêmes chez la levure que chez tous les organismes (Cooper, 1982 ; Magasanik, 1992). En effet, l'activité NADP-GDH, qui catalyse la glutamate déshydrogénase, est maximale lorsque la levure est cultivée sur un milieu dont l'ammonium est la seule source d'azote, tandis que l'activité NAD-GDH, qui catalyse le catabolisme oxydatif du glutamate, est au plus haut niveau lorsque la principale source d'azote est le glutamate. Dans les deux cas, il y a formation de glutamate qui est à la base de toutes les réactions de biosynthèse des acides aminés. Ainsi, selon le précurseur carboné, on distingue six groupes biosynthétiques des acides aminés :

- à partir de l' α -cétoglutarate sont formés la proline, le glutamate et l'arginine
- de l'aspartate, dérivent l'asparagine, la méthionine, la lysine, la thréonine et l'isoleucine, l'adénine, l'homocystéine.
- Le pyruvate est le point de départ de la synthèse de l'alanine, de la valine et de la leucine.
- Le 3-phosphoglycérate conduit à la formation de la sérine, de la leucine et de la cystéine.
- L'histidine est formée à partir du ribose5-phosphate
- Le phosphoénolpyruvate et l'érythrose4-phosphate conduisent à la formation de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane.

La levure peut aussi synthétiser les acides aminés qui lui sont nécessaires à partir des acides aminés du moût par diverses réactions. La voie la plus générale appelée transamination (catalysée par les transaminases) est le transfert du groupement α -aminé d'un acide aminé (principalement le glutamate) sur le groupe cétone d'un acide α -cétonique pour former l'acide aminé correspondant. Les acides aminés peuvent aussi être désaminés (désamination oxydative) et le résidu azoté est transféré sur un chaînon carboné.

II.3.3. Evolution des constituants azotés du moût au vin.

L'évolution des substances azotées du moût de raisins au cours de la fermentation alcoolique dépend de leur nature et de leurs concentrations respectives mais aussi de la souche de levure utilisée. L'ion ammonium est préférentiellement (et généralement totalement) utilisé (J.M. Salmon et coll., 1998 ; G. Beltran et coll., 2004 ; S. Colombié et coll., 2006, P. Taillandier et coll., 2007). Pour les acides aminés du moût, leur vitesse de consommation diffère d'un acide aminé à un autre ce qui a conduit à les classer en différents groupes (V. Jiranek et coll., 1995 ; G. Beltran et coll., 2004). Généralement lors de la fermentation alcoolique l'ion ammonium et la majeure partie des acides aminés sont totalement consommés au bout des 50 premières heures de la fermentation (V. Jiranek et coll., 1995 ; G. Beltran et coll., 2004). Cependant, certains acides aminés semblent ne pas être assimilés par la levure : c'est le cas de la proline qui se retrouve en fin de fermentation presque dans les mêmes proportions qu'au temps initial. Dans certains cas, il peut y avoir en fin de fermentation une libération des acides aminés intracellulaires qui se retrouvent alors dans le milieu extracellulaire. On sait aussi que les acides aminés interviennent dans le mécanisme de synthèse des alcools supérieurs par la levure. Enfin, la teneur en azote assimilable du moût peut conditionner la cinétique fermentaire mais aussi sa propre évolution pendant la fermentation alcoolique. Plus un moût est concentré en azote assimilable, plus une grande quantité sera consommée comme le font remarquer Taillandier et coll. (2007).

II.3.4. La matière minérale

La composition minérale des moûts et des vins dépend de plusieurs facteurs : le niveau minéral du sol, la méthode de fertilisation, le cépage (Maarse et coll., 1987 ; Rupasinghe et coll., 2007) et les conditions dans lesquelles se déroule la fermentation (ajout de sels minéraux). Du moût au vin, certains minéraux subissent des pertes par formations de sels d'acides organiques qui précipitent réduisant ainsi la concentration en ions libres. Selon les travaux de Alvarez et coll. (2007) sur la composition minérale du vin « Montilla-Moriles fino », la matière minérale peut être classée en deux catégories : le groupe des majoritaires comprenant K, P, Mg, Ca, Na et le groupe des minoritaires représenté par le Zn, le Mn, le Fe, le Cu, l'Al, le Sr et le Ba.

II.3.4.1. Les cations

- Le potassium

Le potassium est l'élément minéral prédominant de tous les types de vins et de moûts. Sa concentration varie d'un vin à l'autre, mais la valeur moyenne est de l'ordre de 1000 mg.L^{-1} . La teneur en potassium est plus importante dans les vins rouges que dans les vins blancs. Sous l'effet du froid et de l'alcool, il forme des sels de bitartrate de potassium avec l'acide tartrique, réduisant l'acidité et augmente par conséquent le pH.

- Le calcium

Comme le potassium, le calcium fait partir des sels minéraux majoritaires. La teneur est fonction du pH, du titre alcoolique et la solubilité de son sel diminue avec la teneur en alcool. Ainsi, les vins contiennent toujours moins de calcium que le moût qui leur a donné naissance.

- Le sodium

La teneur en sodium varie, en général, de 10 à 40 mg.L^{-1} . Dans les vignobles de bords de mer, cette concentration peut être plus élevée.

- Le magnésium

Les vins contiennent plus de magnésium que de calcium car pendant la fermentation et la conservation, on ne note aucun changement de sa teneur. Les teneurs normales vont de 60 à 150 mg.L^{-1} .

A côté de ces cations majoritaires, on peut noter également la présence du cuivre, du fer, du manganèse, de l'argent, etc....

II.3.4.2. Les anions

Les anions des moûts et vins sont aussi divers que les cations. Ce sont :

- L'anion chlore

Sa teneur dans les vins est variable. Dans la majorité des cas la teneur est de l'ordre de 50 mg.L^{-1} .

- L'anion sulfate

Le vin contient, à l'état naturel, une petite quantité de sulfates provenant du raisin. Cette teneur est généralement comprise entre 100 et 400 mg.L^{-1} exprimée en K_2SO_4 . Cette teneur s'élève progressivement au cours de la vinification et de l'élevage du vin sous l'effet des apports d'éléments nutritifs et des sulfitages successifs. La correction de l'acidité par apport d'acide sulfurique est interdite.

- **L'anion phosphate**

Il existe naturellement dans le vin sous forme minérale et sous forme organique. Les vins blancs renferment 70 à 500 mg.L⁻¹ de PO₄, les vins rouges 150 à 1000 mg.L⁻¹. Une teneur un peu élevée en acide phosphorique facilite la casse phosphatoferrique, qui est une précipitation de phosphate ferrique dans les vins aérés.

A côté de ces anions, on trouve également du nitrate, du brome, de l'iode, du fluor, du silicium, du bore et d'autres sous forme de trace.

Comme nous le voyons, le moût de raisins (et le vin) est constitué d'une multitude de composés qui peuvent lorsqu'ils sont assimilés ou produits, influencer l'évolution du pH lors de la fermentation.

II.4. Les transports membranaires

L'objet de notre étude concerne l'effet de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* sur les équilibres acide/base du milieu et donc le pH. Ces modifications du pH sont liées soit à l'excrétion soit à la consommation de protons, d'acides organiques, de composés azotés mais aussi de l'alcool par la levure. Etant à l'interface cellule/milieu, les membranes cellulaires jouent un rôle essentiel dans tous ces mécanismes d'absorption ou d'excrétion et les règles qui régissent ces échanges transmembranaires sont donc à considérer.

Le caractère hydrophobe de la double couche lipidique permet à la cellule de maintenir des concentrations de solutés différentes de part et d'autre de la membrane, c'est-à-dire d'abord entre cytoplasme et milieu extracellulaire mais ceci est aussi vrai pour chaque compartiment cellulaire (mitochondrie, lysosome, vacuole, etc.). La séparation des compartiments définis par la membrane ne doit cependant pas être totale et des échanges moléculaires sont nécessaires à la vie cellulaire. Ainsi afin d'assurer l'approvisionnement en métabolites, l'élimination des déchets métaboliques et le maintien de concentrations ioniques bien définies les cellules ont développé des systèmes de transport d'ions et de macromolécules faisant intervenir des protéines membranaires : transporteurs, pompes ou canaux.

II.4.1. Les protéines membranaires de transports

Il y a trois principales classes de protéines membranaires de transport :

- Les canaux, pores permettant le mouvement passif d'ions (canaux ioniques) ou de molécules de petite taille (H_2O , glucides, acides aminés, nucléotides) avec une capacité de transport d'environ 10^7 à 10^8 molécules/sec.
- Les pompes, avec une capacité de transport actif d'environ 10^2 à 10^3 ions/sec. Ce sont des protéines qui hydrolysent l'ATP et qui sont donc qualifiées d'ATPases. Ce type de transport est dénommé « transport actif primaire ».
- Les transporteurs qui assurent un transport passif (uniport) ou actif (symport et antiport) avec une capacité de transport 10^2 à 10^4 molécules/sec. Ce transport actif nécessite la constitution préalable d'un gradient ionique (par une pompe) et est aussi dénommé « transport actif secondaire ».

II.4.1.1. Les canaux

Les canaux sont des véritables pores constitués d'une (comme la glucose perméase HXT et le canal de Cl^-) ou plusieurs (comme le canal Na^+ , le canal K^+ ou la jonction GAP, General Aminoacid Permease) sous unités protéiques transmembranaires. Le passage à travers la membrane nécessite peu de changements de configuration de la protéine de transport et la sélectivité de transport dépend de la nature des canaux. Pour les canaux ioniques le passage semble être déterminé par deux paramètres : les forces électrostatiques à l'intérieur du canal et le diamètre du pore. Les ions qui entrent perdent la plupart des interactions électrostatiques avec l'eau et établissent de nouvelles interactions avec le pore. L'intérieur des canaux anioniques (comme Cl^-) est faiblement positif et celui des canaux cationiques (comme K^+) est faiblement négatif. L'ion est alors attiré par la faible charge opposée et se positionne au milieu du canal dans un environnement électrostatique favorable. Il traversera complètement à la suite de l'entrée d'autres ions de même charge qui le repousseront vers l'autre côté du canal. La différence de potentiel électrique au travers de la membrane (potentiel de membrane) joue aussi un rôle important parce qu'elle peut s'opposer à la sortie des ions, constituant une force de répulsion en direction opposée au passage. La résultante est nommée gradient électrochimique. Dans le cas des jonctions « Gap », la sélectivité du transport semble presque secondaire.

L'ouverture des pores est généralement sous la dépendance de la fixation d'un ligand, de l'interaction avec un composant intracellulaire (nucléotide cyclique) ou d'un changement dans le potentiel membranaire (canaux dépendant du voltage).

II.4.1.2. Les pompes et les transporteurs

Les transporteurs et les pompes sont généralement formés de plusieurs sous-unités protéiques dont certaines sont plusieurs fois transmembranaires. Les transporteurs transfèrent les molécules de soluté à travers la membrane selon le principe d'une réaction enzyme-substrat : $E + S \rightarrow ES \rightarrow P + E$ (E étant le transporteur, S le soluté dans le compartiment initial, et P le soluté transféré dans le compartiment final), ce qui implique un profond changement de la configuration des protéines qui les constituent. Cette approche permet la détermination de constantes physicochimiques (V_{\max} et K_m) caractéristiques de chaque transporteur. Les transporteurs possèdent un ou plusieurs sites de fixation spécifiques du substrat. Cependant, à la différence d'une réaction enzyme-substrat, le soluté transporté n'est pas modifié.

Les transporteurs qui assurent un transport actif fonctionnent avec l'aide d'un gradient ionique constitué préalablement. Ce sont les systèmes de co-transport dans lesquels le transfert d'un soluté dépend du transfert simultané d'un second soluté. Quand les deux solutés vont dans la même direction, c'est un symport ; quand ils vont en direction opposée, c'est un antiport.

Les pompes sont définies comme des protéines de transport qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Bien que les détails moléculaires soient inconnus, il est probable que les transporteurs transfèrent le soluté en subissant un changement de conformation réversible qui expose alternativement le site de liaison du soluté sur une face de la membrane, puis sur l'autre face.

II.4.2. Les différents types de transports

Le transfert d'une espèce (chargée ou non) à travers une membrane s'accompagne d'une variation d'enthalpie libre que l'on peut estimer. Une variation négative définit une diffusion, c'est-à-dire un transfert spontané ne consommant pas d'énergie, et une variation positive qualifie un transport, c'est-à-dire un processus non spontané dont la réalisation exige un couplage avec un processus exergonique.

II.4.2.1. Les diffusions.

i. *La diffusion simple.*

Elle se produit à travers la double couche lipidique des membranes ; elle ne concerne donc pas les espèces chargées qui sont très lipophobes. La diffusion simple obéit à la loi de Fick. Les espèces vont donc des compartiments de plus forte concentration aux compartiments de plus faible concentration.

ii. *La diffusion facilitée.*

Elle concerne les molécules dont la traversée de la bicouche lipidique est cinétiquement défavorisée en raison de leur faible liposolubilité. Il s'agit cependant toujours d'une diffusion puisqu'elle s'opère à variation négative d'enthalpie libre. Lorsque le soluté n'est pas chargé la diffusion se fait selon le gradient de concentration, mais à travers une structure protéique membranaires (une perméase) qui accélère la diffusion. Une diffusion facilitée peut se représenter comme une diffusion catalysée par une enzyme particulière. Cinétiquement, on distingue une diffusion simple d'une diffusion facilitée par le fait que cette dernière est caractérisée par un phénomène de saturation. En effet, alors qu'un flux diffusif simple est proportionnel à la surface de membrane traversée (loi de Fick), un flux facilité est, de plus, limité par le nombre de points de passages, donc par la densité de molécules de perméase dans la membrane ; ce qui explique le phénomène de saturation qu'évoque la courbe hyperbolique de cette cinétique.

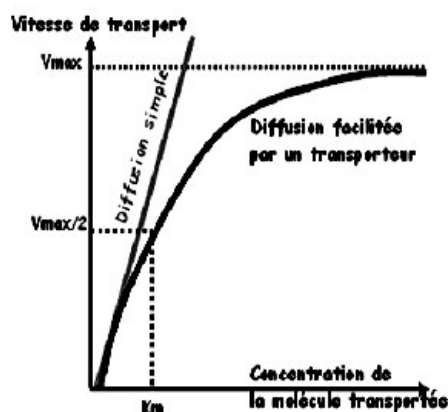


Figure II.1. Flux diffusif selon la loi de Fick
(<http://www.sciencebio.com/FacBio/BioCell/Membrane/FBMF5.htm>)

Lorsque le soluté est chargé (ions minéraux comme le sodium ou le potassium, par exemple), la diffusion se fait alors selon le gradient électrochimique (de concentration et de potentiel électrique). Ainsi, le sens de la diffusion facilitée d'un ion ne peut pas être déduit de la seule connaissance des concentrations. Pour peu que le gradient électrique le permette, un ion peut diffuser spontanément contre son gradient de concentration ; il faut et il suffit pour cela que le terme DG soit négatif. Ici encore, une structure protéique facilite la diffusion mais n'affecte pas son sens. Une différence importante doit cependant être notée ici ; alors que la diffusion facilitée fait intervenir une perméase pour les composés neutres avec un fonctionnement michaelien (interaction entre la perméase et le soluté transféré), les ions diffusent à travers de simples canaux dont la traversée ne suppose pas un changement de conformation. Il n'en reste pas moins que la cinétique d'une telle diffusion facilitée conserve le caractère d'une saturation, ce qui s'explique par le fait que les canaux sont en nombre fini dans les membranes. Les canaux ioniques ne sont pas toujours ouverts, ils ont souvent besoin d'une excitation extérieure, cette excitation peut être chimique, électrique ou mécanique suivant les canaux.

II.4.2.2. Les transports actifs.

i. Transport actif primaire.

Qu'ils soient chargés ou non, les solutés peuvent être activement transportés contre leur sens spontané de diffusion, c'est-à-dire contre leur gradient chimique ou électrochimique et donc par couplage avec un processus exergonique. On parle de transport actif primaire lorsque c'est une réaction chimique exergonique qui est couplée au transport. (Le plus souvent on a hydrolyse d'ATP). Un modèle maintenant classique est celui de la pompe sodium potassium des cellules animales. C'est l'hydrolyse de cet ATP qui fournit l'énergie nécessaire au transport.

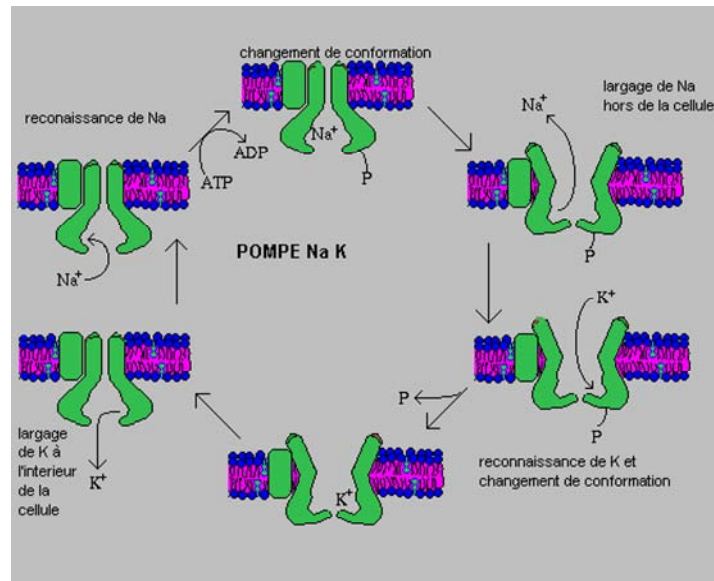


Figure II.2. Schéma d'un transports actif primaire : cas de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. On a une sortie de 3 Na^+ pour une entrée de 2 K^+ .

ii. *Transport actif secondaire.*

On parle de transport actif secondaire lorsqu'un soluté est pompé (contre, donc, son gradient électrochimique) en utilisant un gradient de concentration ionique mis en place par une pompe primaire. Très souvent le gradient de concentrations utilisé est le gradient de sodium de la pompe sodium potassium. Le transport de la substance peut se faire dans le même sens que celui du sodium, on parle alors de symport, ou dans le sens contraire, on parle alors d'antiport.

Ici le transport du glucose se fait dans le même sens que celui du Na^+ , c'est donc un symport.

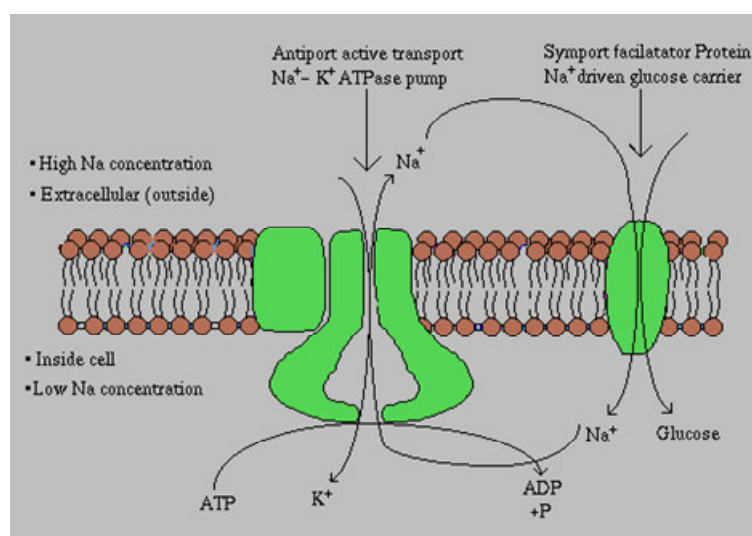


Figure II.3. Schéma d'un transports actif secondaire : antiport et symport actifs.

II.4.3. Le transport des sucres

En conditions oenologiques, les sucres fermentescibles par la levure sont exclusivement le glucose et le fructose. Le transport de ces hexoses vers l'intérieur de la cellule s'effectue par l'intermédiaire de systèmes de transport caractérisés par leur faible affinité pour le glucose ($K_m \approx 10$ à 20 mM) et le fructose (K_m : 50 à 70 mM) (Serrano et Delafuente, 1974). De récentes études ont montré que le transport des sucres chez *Saccharomyces cerevisiae* est extrêmement contrôlé et particulièrement complexe: *Saccharomyces cerevisiae* possède en effet un système multigénique de transporteurs du glucose comme celui observé chez les cellules supérieures (mammifères). Parmi 11 gènes suspectés d'être impliqués dans ce transport des hexoses, 2 seulement (HXT1 et HXT3) sont réellement actifs en conditions oenologiques (du fait de la forte concentration en sucres du milieu) (Bisson et coll., 1993; Lagunas, 1993; Ozcan et Johnston, 1995).

Cette activité de transport des hexoses est régulée par la disponibilité en azote assimilable dans le milieu extérieur et par l'activité de synthèse protéique des cellules: dès que l'activité de synthèse protéique décroît ou cesse, on observe une diminution de l'activité de transport des hexoses (phénomène appelé inactivation catabolique) (Busturia et Lagunas, 1986). Cette diminution d'activité correspondrait à une séquestration des transporteurs membranaires par endocytose suivi d'une dégradation plus tardive de ces transporteurs par protéolyse.

En conditions oenologiques, le taux de synthèse protéique commence à décroître très tôt lors de la fermentation, avant que la biomasse maximale soit atteinte (Salmon, 1989). Le phénomène d'inactivation catabolique des systèmes de transport des hexoses intervient alors, et est notamment accéléré lors de carences du milieu en azote assimilable. L'importance de ce phénomène en oenologie tient au fait que, dans ces conditions, l'activité de transport des hexoses représente le principal événement limitant de la fermentation alcoolique en phase stationnaire: environ 50 à 75 % de la fermentation alcoolique est réalisé par des cellules en phase stationnaire pour lesquelles une étroite corrélation a été trouvée entre vitesse de fermentation mesurée expérimentalement et vitesse de fermentation déduite des vitesses de transport des sucres sur moûts réels (Salmon et coll., 1993; Salmon et Mauricio, 1994).

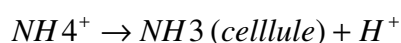
Une addition d'azote assimilable en cours de phase stationnaire, à condition qu'elle ne soit pas réalisé trop tardivement, permet de restaurer partiellement une activité de synthèse protéique et en conséquence une réactivation des systèmes de transport des hexoses, restaurant ainsi une certaine activité fermentaire (Bely et coll., 1994). Toutefois cette restauration d'activité de transport des hexoses peut s'effectuer en présence d'un inhibiteur

spécifique de la glycosylation des systèmes de transport (tunicamycine B), indiquant ainsi qu'une synthèse *De Novo* des systèmes de transport n'est pas nécessaire pour une reprise de l'activité de transport : ce résultat pourrait étayer le rôle d'une séquestration des systèmes de transport des hexoses par endocytose dans le phénomène d'inactivation catabolique.

II.4.4. Le transport des ions ammonium

L'ion ammonium est la source azotée la plus assimilée par la levure. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Dubois et Grenson (1979) ont montré qu'il existe pour l'ion ammonium deux transporteurs (perméases) possédant des affinités différentes (K_m : 0.2 et 2 mM respectivement). Selon ces mêmes auteurs, ce transport s'effectue par l'intermédiaire d'un uniport électrophorétique accumulatif permettant d'atteindre des concentrations intracellulaires de l'ordre de 850 à 1000 fois la concentration extracellulaire. Cette activité de transport nécessite la présence d'une source de carbone énergétique pour être fonctionnelle. En outre, elle est inhibée de façon non compétitive par certains acides aminés (arginine, aspartate notamment) (Roon et coll., 1975 ; Egbosimba et Slaughter, 1987).

Très tôt, diverses études (Kotyk (1989) et Sigler et coll. (1981)) ont montré qu'au cours de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu où l'ion ammonium est la seule source d'azote, il y a une baisse du pH. Cette assimilation de l'ion ammonium serait donc liée à l'excrétion des protons dans le milieu extracellulaire. Ainsi, selon Won J.I et coll. (1993) une mole d'ions ammonium assimilée correspond à une mole de protons excrétée, ce qu'ils expriment par la relation suivante:



Plus tard, Castrillo J.I et coll. (1995) mettent au point une méthode pour déterminer le taux spécifique de protons produits (qH^+) par une culture de *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu ne contenant que l'ion ammonium comme source d'azote et confirment ce lien direct entre l'assimilation de l'ion ammonium et l'acidification du milieu (figure II.4).

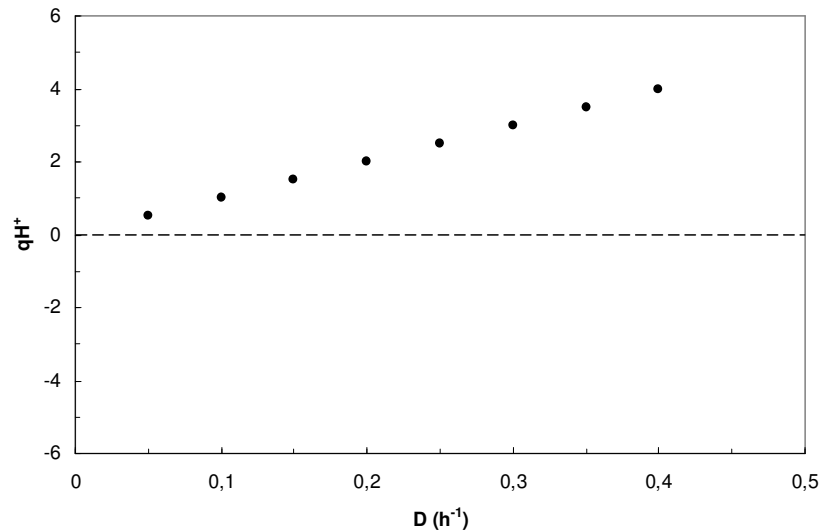


Figure II.4. Simulation du taux spécifique de production de protons (qH^+ , mmol h^{-1} par g de biomasse ; D, le taux de dilution) dans une culture en chemostat de *C. utilis*. Source d'azote : ion ammonium (Castrillo J.I et coll., 1995).

En définitive, pour des raisons d'équilibre de charge de part et d'autre de la membrane plasmique, l'entrée de l'ion ammonium est couplée à l'excrétion d'un proton par la pompe ATPase de la membrane plasmique selon le mécanisme présenté dans la figure II. 5.

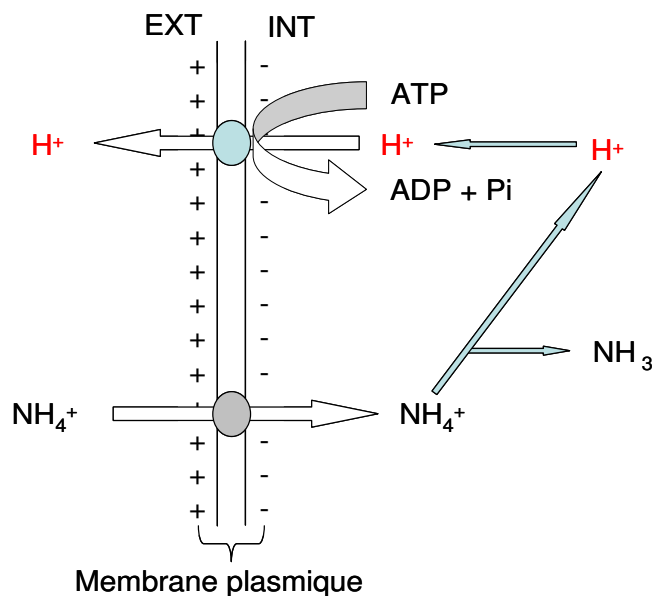


Figure II.5. Schéma de fonctionnement de l'uniport électrophorétique accumulatif responsable de l'entrée de l'ion ammonium chez *Saccharomyces cerevisiae* (Salmon J.M., 1998).

II.4.5. Le transport des acides aminés

Les levures synthétisent deux catégories distinctes de transporteurs d'acides aminés : un système de transport d'un ensemble d'acides aminés (GAP : General Aminoacid Permease) et des systèmes de transport spécifiques d'un seul ou d'un petit nombre d'acides aminés. Chez *Saccharomyces*, on note une capacité de synthèse d'un nombre considérable de transporteurs spécifiques d'acide aminé individuel : Cooper (1982) et Eddy (1982) ont réalisé les caractérisations cinétiques et/ou génétiques de douze de ces systèmes de transports. En 1996, Horak (1996) propose une revue complète sur ces mécanismes de transport des acides aminés chez les micro-organismes eucaryotes y compris les levures

II.4.5.1. Le transporteur GAP

Cette perméase générale des acides aminés (GAP) sert de convoyeur à un ensemble d'acides aminés. Pour *Saccharomyces cerevisiae* la GAP assure le transport de la plupart des acides aminés basiques et neutres (Grenson et coll., 1970 ; Datre et Grenson, 1975) et serait pour les acides aminés tel que glycine, alanine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine (Greasham et Moat, 1973 ; Cooper, 1982) et la proline (Lasko et Brandriss, 1981) la principale porte d'entrée. La GAP peut être inhibée et réprimée par la présence de l'ion ammonium (Ziame et coll., 1987). Son activité ne débiterait en vinification que lorsque le moût ne contient plus d'ion ammonium (Rose, 1987). Elle fonctionnerait donc comme un « récupérateur » d'azote à partir des acides aminés (Cartwright et coll., 1989) qu'à la deuxième moitié de la fermentation. Des théories plus récentes remettraient en cause ce fait et montreraient qu'il existe toujours une activité basale de GAP (Salmon, 2008).

La structure de la GAP est mieux connue que celle des systèmes de transport spécifique. Ainsi, Woodward et Kornberg (1980) ont montré que la GAP est composée d'un plasma membranaire multi-protéines complexe contenant trois polypeptides à poids moléculaire de 53000, 45000 et 30000 dalton respectivement et d'une protéine périplasmique avec un poids moléculaire de 14000. Cette dernière partie est considérée comme responsable de la liaison avec les molécules d'acides aminés pour assurer leur transport à travers la membrane plasmique.

II.4.5.2. Les systèmes de transporteurs spécifiques

Parallèlement au transporteur GAP, il y a bien évidemment des systèmes de transports spécifiques d'acides aminés qui contrairement à l'activité de la GAP ne semblent pas être inhibée par la présence d'ion ammonium dans le milieu.

Grenson et coll. (1966) ont été les premiers auteurs à décrire l'existence de ces systèmes spécifiques de transport d'acides aminés. Ainsi, chaque acide aminé possède son propre système de transporteurs mais certains acides aminés peuvent être pris en charge par deux systèmes de transport distincts. C'est par exemple, et entre autres, le cas de la L-lysine (Kotyk et coll., 1971 ; Keenan et coll., 1982).

Le tableau II.5 récapitule les différents systèmes de transport des acides aminés (Salmon, 1998).

Vu le nombre important d'acides aminés et de systèmes de transporteurs, il n'est pas exclu une forte compétition entre les acides aminés d'une part et d'autre part entre les différents systèmes de transporteurs ; ainsi, par exemple on observe une inhibition compétitive du transport de la L-arginine par la L-ornithine et la L-canavanine et le système de transport de la L-lysine est affecté par le système de transport d'acides aminé basiques.

Il est important de noter que le transport des acides aminés à travers la membrane se fait différemment de celui de l'ion ammonium. Les systèmes sont de type transporteurs actifs symports (Salmon et coll., 1998 ; Ribereau-gayon et coll., 1995). Les auteurs ont des avis différents sur le nombre de protons co-transportés qui varie de un à trois. Ainsi, selon Eddy et Nowacki (1971), le transport de la glycine à travers la membrane nécessite le co-transport de deux protons. Quant à Seaston et coll. (1973), ils établissent que l'accumulation de L-proline, L-méthionine et de L-arginine nécessite le co-transport d'un proton par acide aminé.

Tableau II.5. Récapitulatif des systèmes de transport des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le nombre de protons échangés par types de transporteurs est aussi indiqué.

Acides Aminés	Système de transport	Km (µM)	Répression par l'ion ammonium (NH ₄ ⁺)	Nombre de protons échangés	Références bibliographiques
Acide γ amino-butérique	GABA perméase GAP ⁽¹⁾ PUT4	100 ? 12	oui oui oui	? 2 ?	Mc Kelvey <i>et al</i> , 1990 Grenson <i>et al</i> , 1987 Grenson <i>et al</i> , 1987
Acide L-Glutamique	DAP1 ⁽²⁾ DAP2 GAP1 DIP5	17 ? 1000	non oui oui	2 ou 3 ? 2	Darte et Grenson, 1975 Darte et Grenson, 1975 Darte et Grenson, 1975
L-Alanine	GAP	?	oui	2	Grenson <i>et al</i> , 1970
L-Arginine	Arginine perméase CAN1 GAP	10 8	non oui	1 (actif) 2	Chan et Cossins, 1976 ; Seaston <i>et al</i> , 1973 Chan et Cossins, 1976
L-Asparagine	Glutamine perméase GAP1	350 ?	non oui	? 2	Gregory <i>et al</i> , 1982 Gregory <i>et al</i> , 1982
L-Aspartate	DIP5				
L-Citrulline	GAP1	80	oui	2	Grenson <i>et al</i> , 1970
L-Glutamine	GNP 1 Glutamine perméase 2 GAP	590 >600 40	non non oui	? ? 2	Zhu <i>et al</i> , 1996 Grenson et Dubois, 1982 Grenson <i>et al</i> , 1970
L-Glycine	Glycine perméase GAP 1	400 14000	non oui	? 2	Ballarin-Denti <i>et al</i> , 1984; Ballarin-Denti <i>et al</i> , 1984 Grenson <i>et al</i> , 1970; Seaston <i>et al</i> , 1973
L-Histidine	HIP1 Histidine perméase 2 GAP1	17 4000 25	non non oui	? (actif) ? 2	Crabeel et Grenson, 1970 Crabeel et Grenson, 1970 Grenson <i>et al</i> , 1970
L-Isoleucine	BAP ⁽³⁾	0,31	non	?	Tullin <i>et al</i> , 1991
L-Leucine	Leucine perméase S1, BAP2 Leucine perméase S2 BAP GAP1	40 - 60 140 0,16 ?	non non non oui	? (actif) ? ? 2	Ramos <i>et al</i> , 1980; Schreve et Garrett, 1997. Kotliar <i>et al</i> , 1994 ; Eddy et Nowacki, 1971 Tullin <i>et al</i> , 1991 Ramos <i>et al</i> , 1980
L-Lysine	LYP1 Arginine perméase CAN1 GAP1	25 200 3	non non oui	1 (actif) 1 (actif) 2	Grenson <i>et al</i> , 1966; Seaston <i>et al</i> , 1973 Grenson <i>et al</i> , 1966 Grenson <i>et al</i> , 1970
L-Méthionine	MUP 1 MUP 2 MUP 3 GAP1	12 ? 770 ?	non non oui	1 ? 2	Gits et Grenson, 1967 Isnard <i>et al</i> , 1996 Grenson <i>et al</i> , 1970; Seaston <i>et al</i> , 1973
L-Proline	PUT4 GAP	31 > 2500	oui oui	? 2	Magana-Schwencke <i>et al</i> , 1969; Seaston <i>et al</i> , 1973 Lasko et Bandriss, 1981
L-Sérine	Sérine perméase GAP	250 500	partielle oui	? 2	Verma <i>et al</i> , 1984 Verma <i>et al</i> , 1984
L-Thréonine	Thréonine perméase GAP	? ?	non oui	? 2	Gits et Grenson, 1969 Wiame <i>et al</i> , 1985
L-Tryptophane	Perméase aromatique GAP	410 10	non oui	? 2	Kotyik et Dvorakova, 1990 Grenson <i>et al</i> , 1970
L-Valine	BAP GAP	2 ?	non oui	? 2	Tullin <i>et al</i> , 1991 Grenson <i>et al</i> , 1970
Die et tri Peptides perméase	PTR2				

(1) : GAP = General amino-acid permease ; (2) : DAP = Dicarboxylic amino-acid permease ; (3) : BAP = Branched-chain amino-acid permease (BAP2 ou BAP3).

Bien que Cockburn et coll. (1975) aient montré que le rapport proton-L-glutamine est de 2-3 : 1, Cooper (1982) semble se poser des questions sur la validité de cette théorie. En effet selon cet auteur le nombre précis de systèmes de transport dicarboxylate synthétisé par *Saccharomyces cerevisiae* est discutable : en effet, si deux ou plusieurs systèmes de transport

opèrent simultanément, les mesures stoechiométriques proton/acide aminé sont exposées à être imprécises. Les études de Horak et Kotyk (1986) donnent plus de détails sur l'énergie qui se dégage de l'assimilation de la L-proline : selon ces auteurs, il n'y a pas de relation entre $\Delta\text{protons}$ et l'ampleur de l'accumulation de la L-proline par *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, ils ne considèrent pas que cela soit une preuve contre la mise en œuvre d'un mécanisme proton-symport dans l'assimilation de cet acide aminé. Selon eux, la valeur de $\Delta\text{protons}$ n'est pas un indicateur précis de l'état énergétique de la membrane plasmique.

Certains auteurs ont montré, contrairement au système de transport symport précédemment décrit, que les acides aminés pouvaient être transportés par des systèmes de transport antiports. Il s'agit dans ce cas d'un système de transport actif qui fait entrer des acides aminés en même temps qu'il fait sortir des protons du cytoplasme. Ce système est décrit dans les travaux de Takanori Sato et coll. (1984). Pour cette équipe, il existerait sept systèmes actifs antiport proton/acide aminé indépendants qui sont tous conduits par la force motrice du proton, établie par hydrolyse de l'ATP. Selon leurs travaux les acides aminés qui sont transportés par ces systèmes sont l'arginine, la lysine, l'histidine, la phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine, la glutamine, l'asparagine, l'isoleucine et la leucine.

Le transport des acides aminés dans la cellule peut être couplé aussi à la diffusion de molécule K^+ pour maintenir le gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane plasmique.

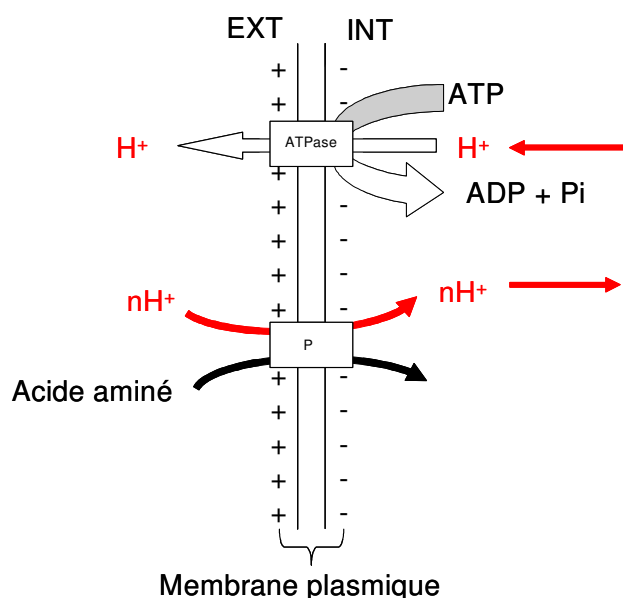


Figure II.6. Schéma de fonctionnement du symport électrophorétique accumulatif responsable de l'entrée d'acide aminé chez *Saccharomyces cerevisiae* (Salmon J.M., 1998).

II.4.6. Transport des peptides et des polypeptides

S'il est acquis que de nombreux di et tripeptides peuvent être utilisés par la levure (Payne et Nisbet, 1981 ; Caldebrank et coll., 1985), comme aussi certains polypeptides comprenant jusqu'à cinq résidus acides aminés (Becker et coll., 1973), peu d'informations sont disponibles sur les transporteurs des peptides et polypeptides chez *Saccharomyces cerevisiae*. Perry et coll. (1994) ont pour la première fois mis en évidence un gène codant pour une perméase spécifique de dipeptides chez *Saccharomyces cerevisiae*.

III. Matériels et méthodes

III.1. La souche de levure

Le microorganisme utilisé pour cette étude est la souche de levure commerciale *Saccharomyces cerevisiae* QA-23 (fournie par Lallemand inc.) disponible sous forme de levures sèches actives. La souche a été activée et conservée sur milieu gélosé à 4°C. La composition de ce milieu est donnée dans le tableau III.1

Tableau III.1. Composition du milieu Levain

Extrait de levure	10 g.L ⁻¹
Glucose	20 g.L ⁻¹
Agar-agar	20 g.L ⁻¹

Afin d'éviter d'éventuelles contaminations par des bactéries, le milieu a été complété par 0,1 g.L⁻¹ de chloramphénicol. Des repiquages réguliers sont effectués tous les trois mois.

III.2. Les milieux d'activation

L'activation des cellules est réalisée dans un milieu de prélevain dont la composition est donnée dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Composition du milieu de pré-levain

Extrait de levure	10 g.L ⁻¹
Glucose	20 g.L ⁻¹
Peptone papainique de soja	20 g.L ⁻¹

Les colonies de la souche de levure sont inoculées dans 100ml de ce milieu à partir de tubes gélosés, puis incubées à 30°C dans un bain marie sous agitation (environ 150 t/min) pendant 24 heures.

30 ml sont alors transférés dans 150 mL du milieu levain dont la composition est donnée dans le tableau 3. L'incubation a lieu dans un bain marie à 30°C pendant 20 heures sous agitation (150 t/min).

Tableau III.3. Composition du milieu Levain

Extrait de levure	1 g.L ⁻¹
Glucose	50 g.L ⁻¹
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,4 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	5 g.L ⁻¹

III.3. Les milieux de fermentation

Dans cette étude, deux types de milieu de fermentation ont été utilisés : des fermentations sur milieux synthétiques et des fermentations sur un milieu moût industriel concentré de raisins blancs.

III.3.1. Les milieux synthétiques

Le milieu synthétique est un milieu standardisé par le laboratoire de recherche UMR-SPO de l'INRA de Montpellier. Sa composition de base est indiquée dans le tableau III.4.

Après avoir complété le volume à 1 litre, le pH est ajusté à 3,3 avec du NaOH à 8N.

Les compositions et la préparation des différentes solutions mères (solution mère d'acides aminés, d'oligoéléments, de vitamines et de facteurs anaérobies) sont présentées en annexe.

Dans notre étude, nous avons fait varier la composition en source azotée assimilable (NH₄⁺ et acides α -aminés) de ce milieu (tableau III.5). Le milieu MS_NH₄ ne contient que du NH₄⁺ comme source azotée. La concentration en atome d'azote de ce milieu est de 420 mg N.L⁻¹. Le milieu MS_AA ne contient que des acides aminés (305 mg d'azote α -aminé par litre) et le milieu MS300 contient les deux sources azotées (120 mg N.L⁻¹ provenant de l'ammonium et 204 mg N.L⁻¹ provenant des acides α -aminés).

Tableau III.4. Composition du milieu synthétique de base.

Matières	Eléments	Concentration en g/L
Sucre	Glucose	200,00
Acides	Ac. malique	6,00
	Ac. Citrique	6,00
Minéraux	KH ₂ PO ₄	0,75
	K ₂ SO ₄	0,50
	MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,25
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,16
	NaCl	0,20
		mL/L
Oligoéléments	Sol. mère	1,00
Vitamines	Sol. mère	10,00
Facteurs anaérobies	Sol. mère	1,00

Tableau III.5. Composition en matière azotée des milieux synthétiques

Types de milieux	Sources azotées		Azote assimilable (mg N/L)
	NH ₄ ⁺ (mg N/L)	Acides α-aminés (mg N/L)	
MS_NH4	420	0	420
MS_AA	0	305	305
MS300	120	204	324

III.3.2. Le moût de raisins

Le moût industriel de raisins blancs fourni par la société SOPAGLY est un moût concentré dont la concentration en sucres totaux (glucose + fructose) est de 767 g.L⁻¹, avec une masse volumique de 1,314 kg.L⁻¹ (63° Brix). Pour des raisons de stabilité, l'acide tartrique a été totalement éliminé. Le moût est conservé dans une chambre froide. Il est dilué quatre fois lors de son utilisation pour les fermentations. Le tableau III.6 présente la composition de ce moût après dilution. Ce moût a été uniquement utilisé pour des fermentations à l'échelle de laboratoire.

Tableau III.6. Composition du moût de raisins blancs

Composants	Concentrations (g.L ⁻¹)
Sucre (g.L ⁻¹)	181,7 ± 4,7
Glycerol (g.L ⁻¹)	1,62 ± 0,14
Acide malique (g.L ⁻¹)	6,37 ± 0,09
Acide citrique (g.L ⁻¹)	1,42 ± 0,53
Potassium (mg.L ⁻¹)	768 ± 40
Calcium (mg.L ⁻¹)	200 ± 10
Magnesium (mg.L ⁻¹)	90 ± 4
Sodium (mg.L ⁻¹)	28 ± 1
Ammonium ion (mg N/L)	74,9 ± 3,0
Acides α-aminés (mg N/L)	136 ± 5,4

III.4. Le matériel de fermentation

Les fermentations réalisées pour cette étude ont été effectuées dans deux lieux différents : à l'INRA-SPO de Montpellier et au Laboratoire de génie chimique de Toulouse. Pour chacun de ces lieux, le matériel de fermentation utilisé a donc été différent.

III.4.1. Les fermenteurs du laboratoire SPO-INRA de Montpellier

Les fermenteurs du laboratoire SPO-INRA de Montpellier ont été conçus spécifiquement pour le suivi de fermentations alcooliques de jus de raisins. Le volume du fermenteur est de 1,4 litres avec un volume utile de 1,2 litres (figure III.1).

Avant inoculation, les fermenteurs sont autoclavés pendant 20 minutes à 120°C sous une pression relative de 1 bar avec 1,2 litres de milieu. Une agitation magnétique avec un barreau aimanté de 1,5 cm assure l'homogénéisation du milieu dans le fermenteur. La température de la salle de fermentation est de l'ordre de 18°C et est maintenue constante grâce à un système de froid centralisé. La température de fermentation est fixée à 20 °C. La régulation de la température à 20 °C se fait à l'aide d'une ampoule électrique de 150 Watts reliée à une sonde thermique dans un doigt de gant du fermenteur. Le fermenteur est posé sur une balance qui permet de suivre l'évolution du poids du milieu et d'en déduire le CO₂ produit. Une sonde

permet la mesure du pH en continu (Erreur expérimentale : 0,05 unité pH). L'acquisition se fait automatiquement toutes les 20 minutes. Les fermentations se déroulent en anaérobie non stricte.

Les fermenteurs ont été inoculés avec le levain à 1 million de cellules/mL.

III.4.2. Les fermenteurs du laboratoire de génie chimique de Toulouse

Les fermentations réalisées au laboratoire de génie chimique de Toulouse (département BIOSYM) se sont déroulées dans des fermenteurs de types New Brunswick Scientific (NBS) de volume utile 2 litres (figure III.1). Une sonde pH (PHM 210 Radiometer Analytical ; erreur expérimentale : 0,05 unité pH) (calibrée avant stérilisation) permet de suivre cette grandeur en continu. La stérilisation a lieu en autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

La température de fermentation est maintenue automatiquement à 20°C par un double dispositif : circulation d'eau glycolée dans un serpentín immergée pour le refroidissement, couverture électrique pour la chauffe.

Un condenseur fonctionnant à l'eau glycolée permet la condensation des gaz en sortie du fermenteur.

L'inoculation pour les expériences réalisées dans ce fermenteur a été réalisée à 8 millions de cellules/mL provenant du levain.

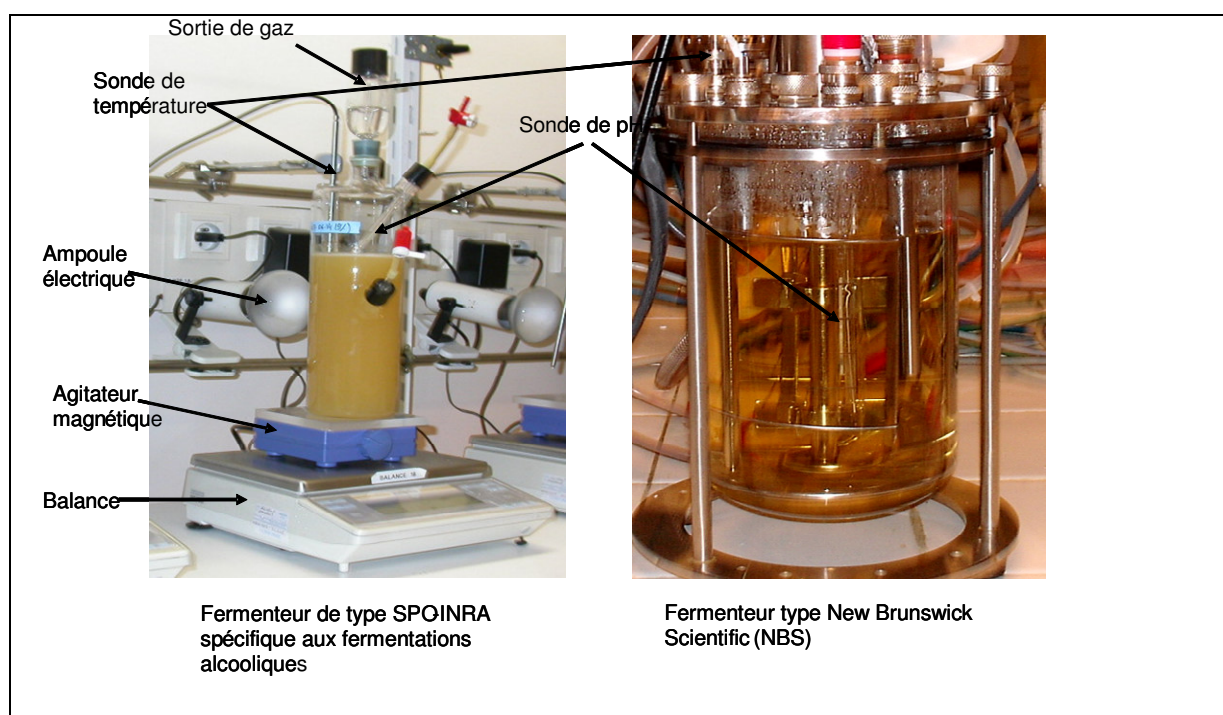


Figure III-1. Les différents types de fermenteurs utilisés dans cette étude.

III.5. Techniques analytiques

III.5.1. Concentration cellulaire

La détermination de la quantité de biomasse pour les fermentations réalisées au LGC a été évaluée par deux méthodes : la numération sur cellule de Thoma et la mesure de densité optique (D.O.).

- La densité optique (D.O.) est mesurée à 640 nm dans des cuves de 1 cm de trajet optique.

- La méthode de numération sur cellule de Thoma consiste à un comptage de cellules sous un microscope optique. La cellule de THOMA est constituée de 16 grands carreaux. Chaque comptage a été réalisé sur cinq grands carreaux (1 carreau à chaque angle (4 carreaux), et le cinquième carreau de la troisième ligne). De cette manière, il faut compter entre 100 et 150 cellules sur la lame afin d'obtenir un pourcentage d'erreur inférieur à 10% pour la numération. Dans le cas contraire, il est nécessaire de compter des carreaux supplémentaires (si pas assez de cellules) ou de diluer l'échantillon (si trop de cellules).

La concentration cellulaire est obtenue grâce à l'équation suivante :

$$X(\text{cellules/mL}) = \frac{\text{nombre de cellules comptées}}{\text{nombre de grands carreaux comptés}} \times \text{dilution} \times 250000$$

Il est possible d'estimer également par cette méthode le pourcentage de cellules viables. Pour cela, après mélange (vol/vol) pendant 10 minutes de la suspension cellulaire avec une solution de bleu de méthylène (1 mg de bleu de méthylène par litre de citrate de sodium à 2 %), il suffit de compter les cellules bleues et les cellules incolores : les cellules mortes sont colorées en bleu, alors que les cellules vivantes ont réduit le bleu de méthylène et apparaissent incolores (Anon, 1971).

Dans le cas des fermentations réalisées au laboratoire SPO-INRA de Montpellier, la détermination de la concentration cellulaire a été réalisée à l'aide d'un compteur électronique de particules Beckman Coulter, modèle M3.

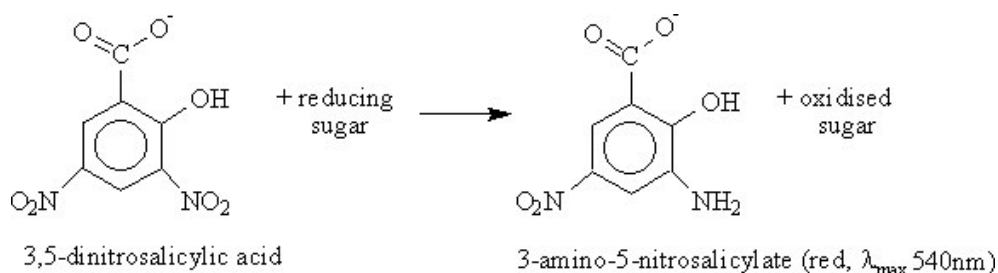
Le comptage électronique de particules, développé par la société Beckman-Coulter, repose sur le principe Coulter (ou méthode « Electrical Sensing Zone »), qui consiste à mesurer des

changements de résistance électrique produits par des particules non conductrices en suspension dans un électrolyte (Isoton II en l'occurrence). Une petite ouverture (orifice ou « aperture » d'un diamètre de 100 μm) entre deux électrodes constitue la zone de détection à travers laquelle l'appareil force les particules en suspension à passer. Dans cette zone, chaque particule déplace son propre volume d'électrolyte. Le volume ainsi déplacé est mesuré sous forme d'une impulsion de voltage, la hauteur de cette impulsion étant proportionnelle au volume de la particule.

Cette méthode est indépendante de la forme, de la couleur ou de la densité des particules. Le comptage s'effectue par un prélèvement de 500 μL d'échantillon dans l'accuvette. Deux comptages ayant été effectués sur chaque échantillon (donc 2 X 500 μL prélevés), il suffit d'additionner les deux valeurs de comptage obtenues et de multiplier cette valeur par la dilution pour obtenir directement le nombre de particules par mL.

III.5.2. Dosage des sucres totaux par la méthode du DNS

Seuls les sucres réducteurs sont mesurés par cette méthode. Pour un moût de raisins, il s'agit de la somme du glucose et du fructose. La fonction réductrice se complexe sous certaines conditions avec le réactif DNS (acide Di-Nitro-3,5 Salicylique), ce qui se traduit par une coloration orangée. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en sucres.



Une défection préalable au dosage est nécessaire sur les échantillons fermentés afin d'éliminer les protéines (substances réductrices) pouvant interférer avec le dosage au DNS.

Ce traitement consiste à mélanger 4 mL d'échantillon avec 0,5 mL de ZnSO_4 à 5 % et 0,5 mL de Ba(OH)_2 à 0,3 N. Après un temps de contact de 10 minutes, on élimine le précipité formé par centrifugation ou filtration.

Pour réaliser le dosage, on effectue dans un tube à essai le mélange de 1 mL de réactif DNS (8 g de soude, 5 g d'acide Di-Nitro-3,5 Salicylique, 150 g de tartrate double de sodium et de potassium, complété à 500 mL avec de l'eau et conservé à l'abri de la lumière) avec 1 mL

d'échantillon à analyser précédemment déféqué et dilué de façon à se trouver dans la gamme d'étalon (0-2 g.L⁻¹ équivalent glucose). Après homogénéisation du mélange, on porte le tout à 100 °C pendant 10 minutes. A la sortie du bain-marie, le refroidissement dans un bain de glace et l'ajout de 10 mL d'eau distillée arrête la réaction. La lecture de l'absorbance à 540 nm permet de déterminer, à partir de la gamme étalon et en tenant compte des dilutions, la teneur en sucres totaux des différents échantillons (exprimée en g.L⁻¹). L'erreur expérimentale sur 5 mesures d'un jus de raisins est de 4,7 %.

III.5.3. Dosage des acides organiques, du glycérol et de l'alcool

i. Dosage à l'HPLC

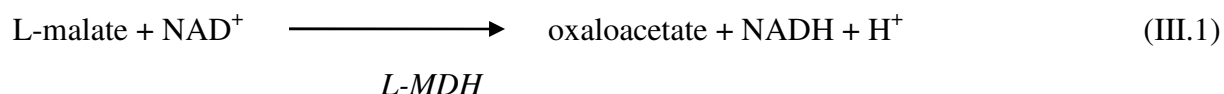
Compte tenu de l'interférence de l'acide tartrique avec le glucose et de l'acide malique avec le fructose, seuls l'acide acétique, l'acide succinique, l'acide citrique et l'acide lactique ont été dosés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). En plus des ces acides organiques, les dosages du glycérol et de l'éthanol sont réalisés par cette méthode. L'appareil utilisé (TSP Spectra System) dispose d'une colonne (Biorad Aminex HXP-87H) spécifique pour la séparation des alcools, acides organiques et des sucres. La phase liquide est constituée d'une solution d'acide sulfurique de concentration 5 mM circulant à un débit de 0,4 mL.min⁻¹. La température de la colonne est fixée à 40°C et le volume de la boucle d'injection est de 20 µL. La détection de chaque composant se fait à l'aide d'un réfractomètre différentiel (TSP RefractoMonitor V). Un logiciel spécialisé (Borwin V 1.2) permet de calculer la surface des pics détectés. Cette surface est corrélée à une valeur de concentration par l'intermédiaire d'une droite de calibration déterminée préalablement pour chaque constituant.

ii. Dosages enzymatiques au Mascot Plus

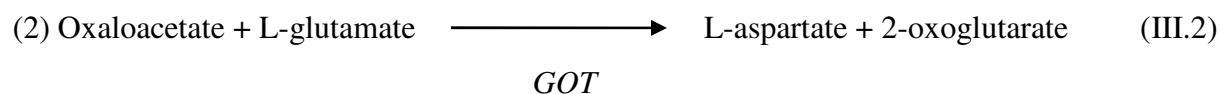
Les dosages de l'acide malique et de l'acide tartrique sont réalisés au Mascot plus. C'est un doseur automatisé géré par un système informatisé (dosage programmé). C'est un dosage par kit enzymatique mono réactif (kit MicroDom) ou à deux réactifs (Kit Biopharm).

- Dosage enzymatique acide malique par kit Mono réactif

L'acide L-malique (L-malate) est oxydé en oxaloacétate par le nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD) en présence de la déshydrogénase de L-malate (L-MDH) (réaction III.1)



Dans la réaction catalysée par la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT), l'oxaloacétate est convertie en L-aspartate en présence du L-glutamate (2) (réaction III.2).



La quantité de NADH formée est stoechiométriquement égale à la quantité de L-malate. L'augmentation du NADH est mesurée au moyen de son absorbance à 340 nm. Grâce une droite d'étalonnage déterminée préalablement, la concentration (exprimée en g.L^{-1}) mesurée s'affiche automatiquement à l'écran. L'erreur expérimentale sur 5 mesures d'un jus de raisins est de 0,1 %. (Référence de la méthode : MicroDom ou Biopharm).

- Dosage colorimétrique acide tartrique par kit mono réactif

En présence de l'acide vanadique, l'acide tartrique réagit en donnant une coloration jaune orangé détectable à 500 nm. C'est cette propriété qui est utilisé dans ce dosage. Le dosage des échantillons se déroule au Mascot plus de manière automatique. Une droite d'étalonnage est préalablement établie. Le résultat du dosage s'affiche à l'écran. L'erreur expérimentale sur 5 mesures d'un jus de raisins est de 1,9 %. (Référence de la méthode : MicroDom)

III.5.4. Dosage de l'azote

Les moûts de raisins renferment trois types majoritaires d'azote. Ce sont les ions ammonium, les acides aminés et les polypeptides. Dans cette étude, nous nous intéresserons au dosage de l'azote assimilable, c'est-à-dire les ions ammonium et l'azote provenant du groupement α -aminé des acides aminés. Le dosage individuel des acides aminés a également été effectué.

i. Dosage des ions ammonium (NH₄⁺)

C'est un dosage par kit enzymatique. En présence de la déshydrogénase de glutamate (GIDH) et du dinucléotide nicotinamide-adenine réduit (NADH), l'ammoniaque réagit avec le 2-oxoglutarate pour donner le L-glutamate. Le NADH s'oxyde en NAD⁺.



La quantité de NADH oxydée dans la réaction ci-dessus est stoechiométrique à la quantité d'ammoniaque. Le NADH est déterminé au moyen de son absorbance à 340 nm.

Le dosage se fait automatiquement au Mascot plus avec le kit enzymatique de MicroDom (Ref. 110 05 037 00). Grâce une droite d'étalonnage déterminée préalablement, la concentration (exprimée en g.L⁻¹) s'affiche à l'écran. L'erreur expérimentale sur 5 mesures d'un jus de raisins est de 5,2 %. (Référence de la méthode : MicroDom ou Biopharm)

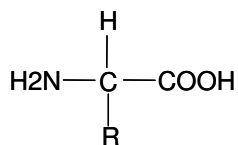
ii. Dosage de l'azote alpha aminé

En présence de o-phthaldialdehyde/N-acétyl-L-cystéine (OPA/NAC), les groupements d'acides aminés primaires réagissent pour former des dérivés d'isoindole stables à la longueur d'onde de 340 nm. C'est un dosage colorimétrique automatisé au Mascot Plus effectué avec le kit de MicroDom (Ref. 110 10 100 00). Grâce une droite d'étalonnage, la concentration (exprimée en g.L⁻¹) s'affiche à l'écran. L'erreur expérimentale sur 5 mesures d'un jus de raisins est de 5,4 %. (Référence de la méthode : MicroDom).

iii. Dosage des acides aminés

Les acides aminés sont des composés organiques qui contiennent au minimum une fonction amine (en général une amine primaire) et une fonction carboxylique, en général sur le même carbone. Ce carbone est également lié à un atome d'hydrogène et à un groupement R

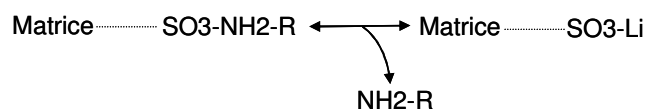
très variable qui donnera à chaque acide aminé ses propriétés, en particulier sa distribution de charge.



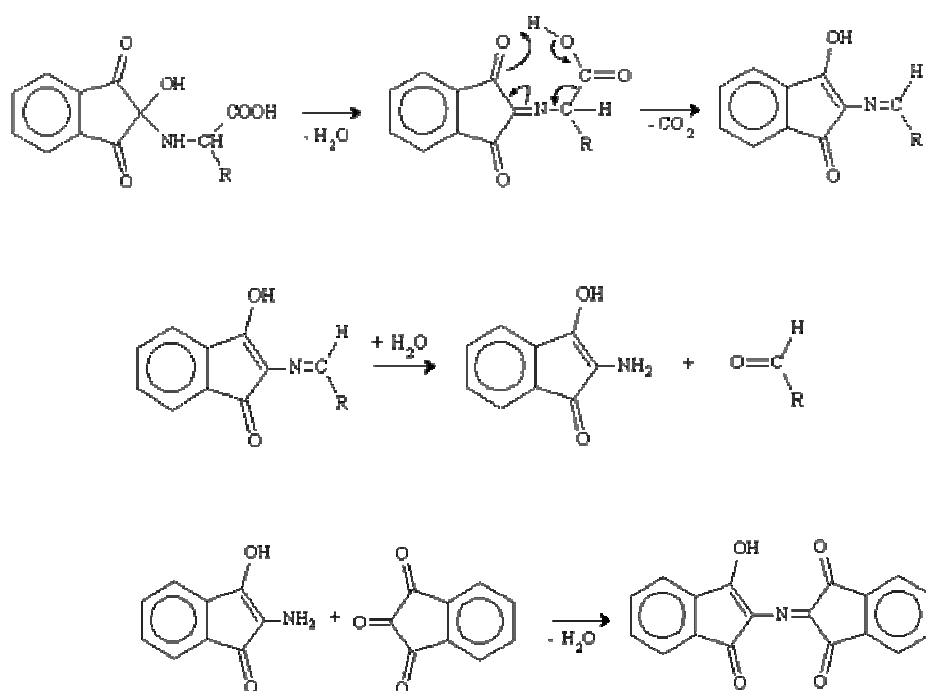
On distingue les iminoacides : proline et hydroxyproline qui n'ont pas de groupement amine primaire, l'azote étant engagé dans une structure de type pyrrolidine. Cette particularité leur donne une coloration différente après réaction avec la ninhydrine.

Ils possèdent au moins chacun des groupes ionisables, avec chacun un pK, ce qui permet de calculer le point isoélectrique (pH_i) de chaque acide aminé, c'est-à-dire le pH auquel il est neutre. C'est cette propriété qui permet de les séparer. Le dosage s'effectue sur l'appareil Biochrom 30 type HPLC (constitué d'une pompe, d'un distributeur d'échantillons, d'une colonne et de solvants). Une connexion à un ordinateur permet l'enregistrement des résultats. Le passage des échantillons nécessite une préparation pour éviter les risques de pollution de la colonne et les interférences.

C'est une méthode de précipitation qui est conseillée pour la majorité des échantillons type fluide physiologique (fluide de Ringer composé d'eau et de minéraux). La méthode de précipitation à l'acide sulfo-salicylique (SSA) a été utilisée. 4 volumes d'échantillon sont mélangés à 1 volume d'un mélange SSA (à 25%)-Norleucine (à 2500 nmol.mL⁻¹). Le standard physiologique (solution commerciale d'acides aminés) est composé d'1 volume du kit sigma A6407, d'1 volume du kit sigma A6282, d'1 volume de solution mère de glutamine (à 2500 nmol.mL⁻¹) et de 2 volumes de tampon de charge. Après avoir passé ces différentes préparations au vortex, on les laisse reposer pendant 1 heures à 4°C. Une centrifugation à 4°C à 1000g pendant 10 minutes s'ensuit. Avant analyse, on procède à une filtration sur membrane 0,12µm de diamètre de pores. Les échantillons peuvent alors être injectés dans la colonne constituée d'une résine cationique (échangeuse de cations). Les acides aminés sont injectés à un pH bas de façon à assurer qu'ils soient chargés positivement. Le pH et la concentration ionique sont augmentés progressivement par l'utilisation d'un gradient de tampons (tampons de citrate de lithium (tableau III.7)). On augmente également la température. Chacun des acides aminés est élué de la colonne lorsque son point isotonique est atteint, l'attraction de la résine étant annulée. On a :



La détection à la ninhydrine est privilégiée par rapport à la détection en fluorimétrie (pourtant plus sensible) car elle permet de détecter tous les acides aminés (dont la proline). La ninhydrine étant un oxydant fort, les acides aminés sont désaminés et décarboxylés simultanément. Il y a formation de ninhydrine réduite (Hydrindantine), d'ammoniaque et de CO_2 . La coloration pourpre de ruheman est la condensation du NH_4^+ avec l'hydrindantine et une nouvelle molécule de ninhydrine (réactions III-4).



Ce composé pourpre absorbe à 570 nm et la quantité formée est proportionnelle à la concentration en acide aminé.

Les acides iminés (proline et OH-proline) n'ont pas de groupement amine libre et donnent un composé jaune détecté à 440 nm. (Référence de la méthode : Biochrom)

Tableau III.7. Tampons de citrate de lithium (www.biochrom.uk) utilisés dans le dosage des acides aminés au Biochrom 30

Nbre	Tampons	pH
1	Citrate de lithium	2,8
2	Citrate de lithium	3
3	Citrate de lithium CII	3,15
4	Citrate de lithium DII	3,50
5	Citrate de lithium	3,55
6	Solution d'hydroxyde de lithium	
Réactif	Ninhydrine	

III.5.5. Dosage du CO₂ dégagé

Le seul composant volatil mesuré au cours de cette étude est le dioxyde de carbone bien qu'il en existe d'autres. En effet, le CO₂ étant un des produits majoritaires de la fermentation alcoolique, il est pris en compte dans l'établissement du bilan carbone.

Pour les fermentations réalisées à l'INRA-SPO Montpellier, le CO₂ dégagé a été calculé à partir de la variation du poids et du volume du fermenteur. Le fermenteur est posé sur une balance et à chaque acquisition du poids, le calcul suivant est effectué :

$$CO_2(t) = CO_2(t-1) + \left[\frac{Poids(t-1) - Poids(t)}{Volume(t)} \right] \quad (III.4)$$

Avec le CO₂ en g.L⁻¹, le poids en g et le volume en L.

On obtient ainsi la quantité de CO₂ dégagé depuis le début de la fermentation en estimant que la perte de poids est entièrement due à la production de CO₂ (hypothèse simplificatrice acceptable étant donné les faibles quantités d'autres volatils produits devant la quantité de CO₂). Lorsqu'un prélèvement est effectué, la perte de poids provoquée par ce prélèvement ne doit pas être confondue avec un dégagement de CO₂. Le logiciel détecte cette situation lorsque la perte de poids entre les deux dernières acquisitions est supérieure à 2 g/l, valeur qui ne peut jamais être atteinte par le seul dégagement de CO₂ (Figure III-2). Dans ce cas, le calcul du dégagement de CO₂ est modifié de la façon suivante :

$$CO_2(t) = CO_2(t-1) + [CO_2(t-1) - CO_2(t-2)] \quad (III-5)$$

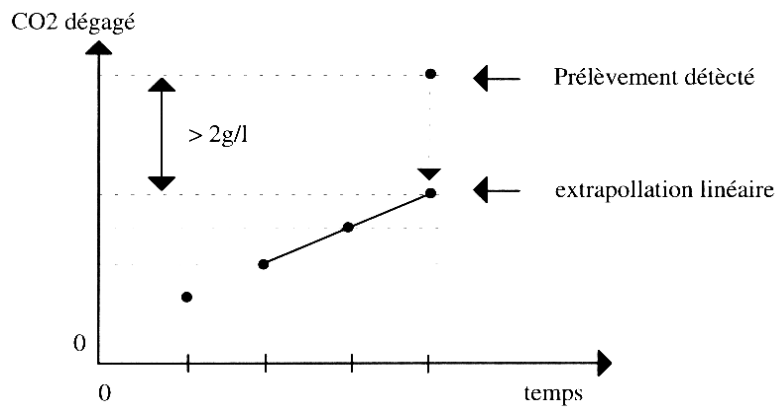


Figure III-2. Correction du CO₂ dégagé par extrapolation linéaire

Le volume est aussi corrigé selon la relation suivante :

$$Volume(t) = Volume(t-1) + \left[\frac{Poids(t-1) - Poids(t)}{1000} + \frac{Poids(t-2) - Poids(t-2)}{1000} \right] \quad (\text{III-6})$$

Pour les fermentations réalisées au LGC, le CO₂ dégagé est suivi par la mesure du débit de gaz de sortie du fermenteur. Une burette graduée de 25 mL contenant de la mousse de savon est connectée à la sortie du fermenteur. Il se forme des bulles de savon. Le dégagement du CO₂ produit crée une pression dans la burette. Lorsque cette pression est supérieure à la pression atmosphérique, la bulle de savon est entraînée vers la sortie. Le temps mis par la bulle pour parcourir le trajet de 25 mL est mesuré. Le débit est exprimé en mL.s⁻¹. Pour déterminer le volume de CO₂ dégagé, un graphe du débit en fonction du temps est tracé. Un lissage polynomial permet par intégration d'obtenir le volume de CO₂ dégagé en fonction du temps.

IV. Modèle de calcul du pH

IV.1. pH et composés des moûts de raisins

Au cours de la fermentation alcoolique, le métabolisme de la levure induit un changement perpétuel du milieu. Ainsi, la consommation des substrats carbonés et azotés s'accompagne de la production de métabolites acides ou alcools. Parallèlement, on observe une évolution du pH comme représenté sur la figure IV.1.

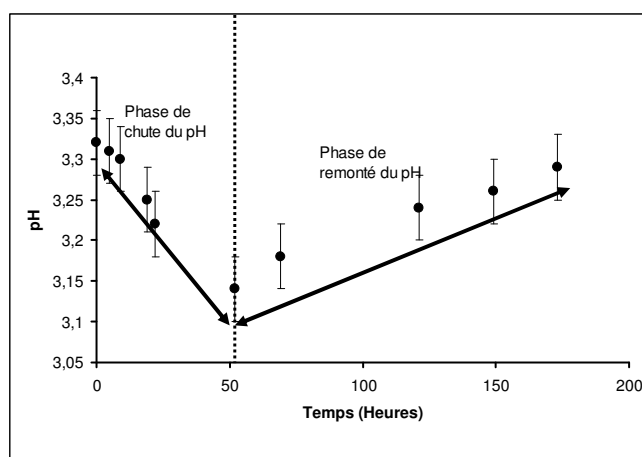


Figure. IV.1. Cinétique classique du pH lors d'une fermentation alcoolique sur du moût de raisins blancs par *Saccharomyces cerevisiae* (pH initial : 3,32 ; Température : 20°C)

Pendant la fermentation alcoolique, l'évolution classique du pH présente deux phases. Durant une première phase on observe une diminution du pH de l'ordre de 0,2 upH. A la fin de cette période, on atteint un pH minimum. La deuxième phase est caractérisée par une augmentation du pH. Cette hausse du pH se poursuit jusqu'à l'arrêt de la fermentation. Souvent, on peut observer une troisième phase pendant laquelle le pH se stabilise.

Nous avons dans un premier temps cherché à caractériser les composés du milieu pouvant exercer une influence sur le pH et à déterminer dans quelle mesure l'évolution de la composition du milieu au cours de la fermentation alcoolique pouvait modifier le pH.

Les moûts de raisins ont un pH acide. Ce caractère acide est le plus souvent lié à la présence d'acides organiques dont les principaux sont l'acide tartrique, l'acide malique et l'acide citrique. La concentration de ces éléments va alors définir le degré d'acidité du moût. Au cours de la fermentation alcoolique, certains composés subissent très peu ou pas de changement. C'est le cas de l'acide tartrique, de l'acide malique et de l'acide citrique.

D'autres composés comprenant des acides organiques et des alcools sont produits par la levure.

Afin de déterminer l'impact de chaque composant sur l'évolution du pH au cours de la fermentation alcoolique, des tests d'ajout de composés sont réalisés in vitro.

IV.1.1. Le sucre

Le sucre est le composé majoritaire des moûts de raisins après l'eau avec une teneur d'environ 200 g.L⁻¹. Il influence les caractéristiques physico-chimiques du milieu telles que la masse volumique et la constante diélectrique. Il agit également sur la viscosité du milieu. D'un milieu riche en sucre en début de fermentation, on obtient une solution hydro-alcoolique contenant très peu ou pas de sucre en fin de fermentation. La disparition du sucre du milieu peut-elle expliquer la chute de pH observée? Pour répondre à cette question, nous avons récupéré un moût de raisins blancs de fin de fermentation alcoolique. Ce moût ne contient donc pas de sucre. A cette solution hydro-alcoolique, nous avons ajouté du sucre à des concentrations variables et mesuré le pH du mélange. Dans la gamme de concentration en sucre testée (0 à 200 g.L⁻¹), le pH garde une valeur constante autour de 3,22 upH. On peut donc considérer que l'évolution de la teneur en sucre au cours de la fermentation ne permet pas d'expliquer l'évolution du pH.

IV.1.2. L'alcool

L'alcool est le composé majoritaire produit lors d'une fermentation alcoolique. L'effet de l'alcool sur la croissance et le métabolisme cellulaire n'est plus à démontrer de nos jours. Cependant son effet sur le pH au cours de la fermentation semble être mal connu. On sait à travers la littérature que l'alcool influence la masse volumique, la constante diélectrique, les coefficients d'activité et par conséquent les constantes de dissociation des composés acides du solvant. Pour mieux comprendre ce phénomène, un test de mesure du pH de moût de raisins blancs à différents degrés alcooliques a été réalisé (moût supplémenté en alcool). La figure IV.2 montre les résultats obtenus.

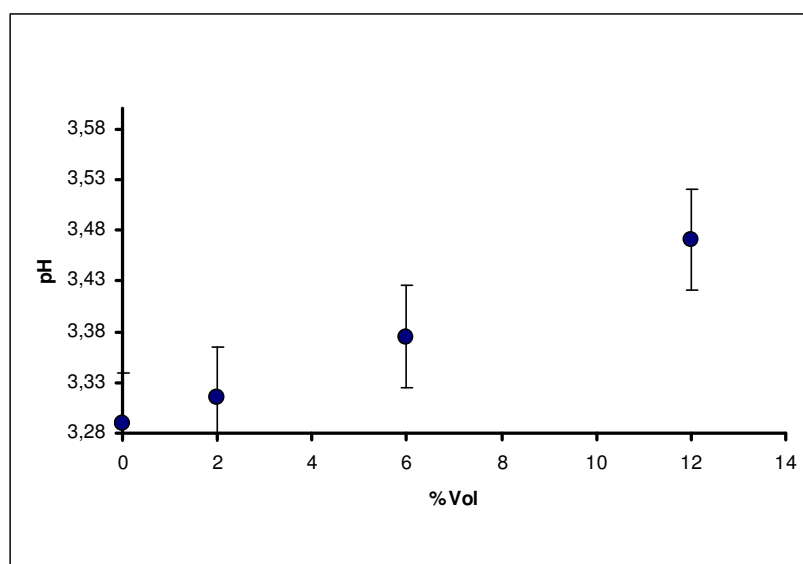


Figure IV.2. Evolution du pH en fonction du degré alcoolique. Test réalisé à 20°C par ajout d'éthanol dans un moût de raisins blancs.

Le pH du moût semble évoluer de manière linéaire avec le degré alcoolique. Plus le milieu est riche en éthanol, plus le pH est élevé. Avec un pH initial de 3,29 à 0 % vol., on passe à 3,47 à 12 % vol soit un delta d'unité de pH de 0,18. Il ressort donc de ce test que l'alcool exerce une influence non négligeable sur la valeur du pH. L'alcool étant produit tout au long de la fermentation alcoolique, l'amplitude de son influence peut expliquer la remontée de pH observée dans la seconde phase mais en aucun cas la chute observée dans la première phase.

IV.1.3. Les composés acides : acides organiques

Il est souvent souligné dans la littérature que la variation du pH au cours de la fermentation alcoolique est l'œuvre des acides organiques produits. Pourtant, il est important de souligner que ces acides organiques sont produits en très faibles quantités, la concentration du plus important atteignant rarement 1 g.L⁻¹. Selon la littérature, l'acide tartrique et l'acide citrique ne sont pas consommés par la levure. Quant à l'acide malique, il est consommé en très faible quantité par certaines souches de levure. Pour quantifier l'influence sur le pH, nous avons orienté les tests sur l'acide succinique étant donné que c'est l'acide organique produit par le métabolisme de la levure en plus grande quantité. Les résultats sont présentés sur la figure IV.3.

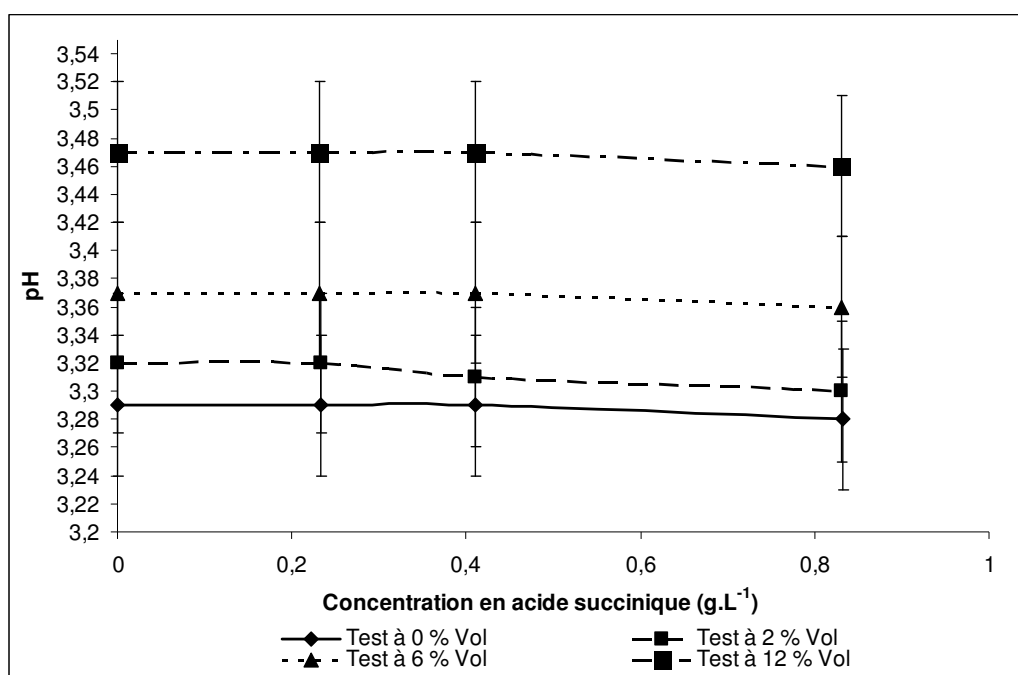


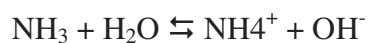
Figure IV.3. Test d'ajout d'acide succinique dans un moût de raisins blancs à différents degrés d'alcool réalisé à 20°C. (pH à $\pm 0,05$).

De manière générale, dans la gamme de variation de concentration en acide succinique de la fermentation, l'ajout de l'acide succinique dans le moût de raisins blancs fait très peu chuter le pH quelque soit le degré d'alcool. A 0 %vol. et à pH initial de 3,29, l'addition de 0,833 g.L⁻¹ d'acide succinique baisse le pH de 0,01. De même à 2, 6 et 12 %vol, la différence entre le pH initial et le pH après l'ajout de 0,833 g.L⁻¹ est de 0,01. Une très légère tendance à la baisse peut être observée quand la teneur en acide succinique augmente mais elle n'est pas significative dans la gamme de la fermentation alcoolique et il faudrait une teneur bien plus élevée pour expliquer la chute de pH observée au cours des premières heures de fermentation. Au regard de ces résultats, nous pouvons donc raisonnablement considérer que ce paramètre est sans influence sur le pH. Cependant, l'influence de l'alcool sur le pH est encore mise en évidence. Son influence est beaucoup plus importante que celle de l'acide succinique dans la gamme de production d'une fermentation alcoolique classique.

IV.1.4. Les sources azotées

IV.1.4.1. Les ions ammonium (NH₄⁺)

L'ammoniac en solution réagit avec l'eau selon l'équilibre :



La constante de dissociation (pK_a) du couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ est de 9,2. Selon le pH du milieu, on évolue d'une forme à l'autre comme indiqué sur la figure IV.4.

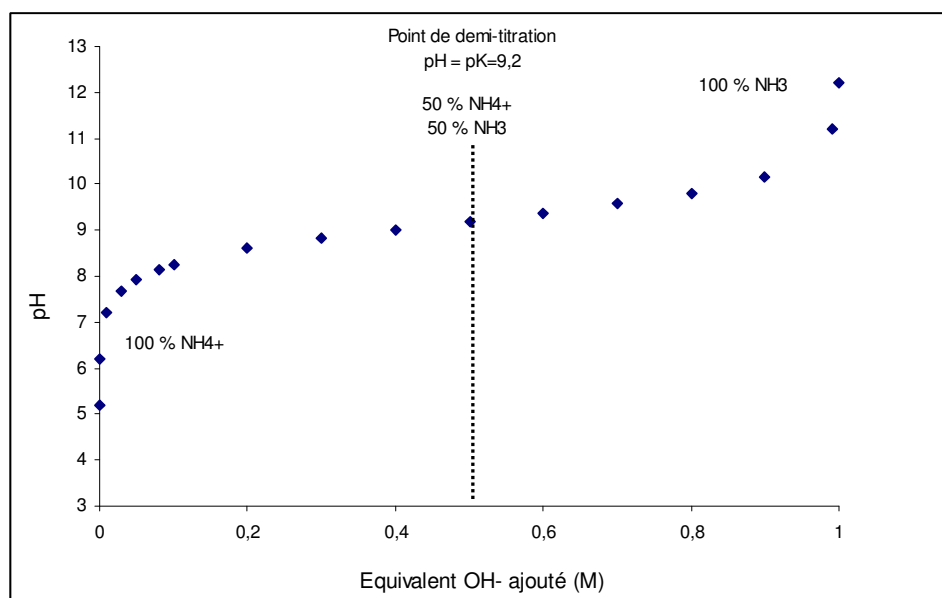


Fig. IV.4. Courbe de titrage acido-basique de 1L de solution à 1M de NH_4^+ : évolution des proportions des formes acido-basiques.

Dans les solutions où le pH est inférieur au pK_a du couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, l'azote ammoniacal est principalement sous sa forme NH_4^+ . Lorsque le pH équivaut au pK_a , les deux espèces sont en quantités égales. Au delà du pK_a , l'azote ammoniacal est principalement sous sa forme neutre NH_3 .

Les fermentations alcooliques se déroulant généralement à des pH acides (autour de 3 unités pH), donc à un pH très inférieur au pK_a du couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, on peut raisonnablement considérer que l'azote ammoniacal se trouve dans ce cas totalement sous sa forme cation (NH_4^+).

Au cours de la fermentation tout l'azote est consommé par la levure. Afin de déterminer son influence sur le pH, des tests d'ajout d'ions ammonium sur du moût de raisins blancs sont effectués dans une gamme variant de 0 à 112,5 mgL^{-1} . Le tableau IV.1 présente les résultats des mesures de pH obtenues.

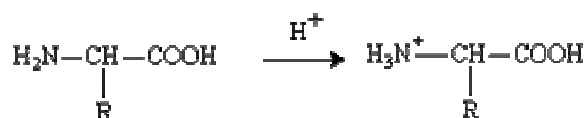
Tableau IV.1. Evolution du pH en fonction de la concentration en ions ammonium du moût de raisins blancs. Test réalisé à 20°C. (pH précision : ±0,05).

ions ammonium (mg/L)	pH
0	3,22
15	3,21
30	3,2
37,5	3,2
75	3,2
112,5	3,22

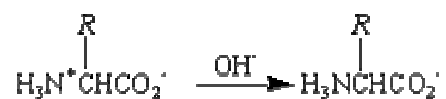
D'après les résultats, on ne note pas de variation significative du pH lorsque la concentration en ions ammonium du moût de raisins diminue. En dehors de tout aspect métabolique, la disparition de l'ion ammonium du milieu au cours de la fermentation ne permet donc pas d'expliquer la chute de pH observée dans les premières heures de la fermentation.

IV.1.4.2. Les acides aminés des moûts de raisins

Les acides aminés contiennent un groupement carboxyle -COOH acide (deux pour les diacides) et un groupement amine -NH₂ basique (deux pour les diamines). En solution, chacun de ces groupements peut exister sous 2 formes, l'une chargée (-COO⁻ ou -NH₃⁺), l'autre neutre. Un acide aminé en solution peut donc exister sous trois formes, deux chargées et une neutre : cation, anion et zwitterion. L'ionisation des acides aminés dépend du type de solvant, de la température et surtout du pH du milieu. Le tableau IV.2 donne les pK des acides aminés essentiels dans une solution aqueuse. En milieu fortement acide, la fonction amine de l'acide aminé s'ionise en captant un proton et inhibe par conséquent la dissociation du groupement carboxyle. Il se forme alors le cation suivant la réaction suivante :



En milieu fortement basique, c'est le phénomène contraire qui se déroule. La fonction carboxyle de l'acide aminé s'ionise en libérant un proton et inhibe par conséquent la dissociation du groupement amine. L'anion se forme selon la réaction qui suit :



Le pH pour lequel les 2 dissociations s'effectuent est appelé point isoélectrique noté pH_i . A ce pH, on a un ion dipolaire appelé zwitterion qui a une charge nette qui est nulle. Nous avons :



La figure IV.5, nous montre l'évolution des proportions des fonctions générales acido-basiques des acides α -aminés. Au pH d'une solution égale au pK_{COOH} de l'acide aminé, il se forme 50 % de cations et 50 % de zwitterions (forme neutre). La forme cation disparaît de la solution lorsque le pH est égal au pH isotonique de l'acide aminé en question. Dans ce cas, c'est uniquement la forme neutre qui existe dans le milieu (zwitterion). Au pH de la solution égale au pK_{NH_2} de l'acide aminé, il se forme 50 % d'anions et 50 % de zwitterions. La disparition de la forme zwitterion a lieu au fur à mesure que le pH devient plus important que le pK_{NH_2} . Ainsi, le milieu se compose à 100 % d'anions quand le pH est largement supérieur au pK_{NH_2} . La plupart des moûts de raisins et des vins ont un pH acide (3 à 4) mais supérieur aux pK_{COOH} de tous les acides aminés. De ce fait, il y a non seulement protonisation du groupement amine mais aussi libération d'ion H^+ du groupement carboxyle. Il se forme des cations et des zwitterions dans des proportions différentes avec une présence quasi nulle de la forme anion. Selon la figure IV.5, la proportion en acides aminés neutres (zwitterions) serait de loin plus importante que celle des cations. Par exemple, pour la glutamine, avec un pK_{COOH} de 2,17, un pK_{NH_2} de 9,13 et un pH isotonique de 5,65 ; dans un moût dont le pH est de 3,3, il se forme environ 93 % d'acides aminés neutre pour seulement 7 % d'acides aminés de charge positive. C'est le cas de la plupart des acides aminés du moût de raisin au pH compris entre le pH isotonique et le pK_{COOH} .

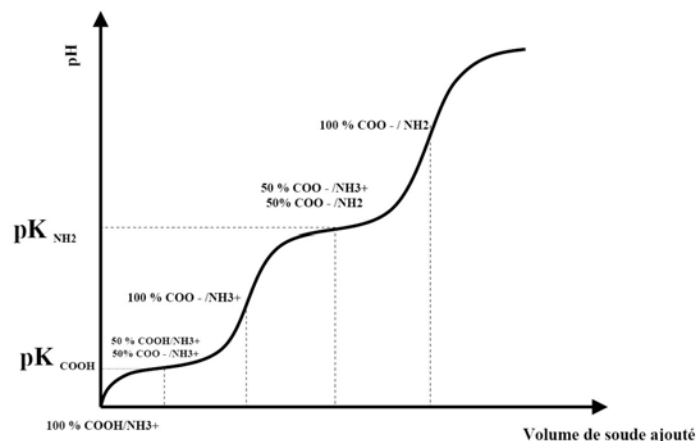






















Figure. IV.5. Evolution des proportions des formes acido-basiques des acides alpha aminés.
(<http://www.scifa.univ-metz.fr/cours/MPARANT/3a---Acides-amines-CM-Etudiant.pdf>)

Ainsi, les travaux menés très tôt par Jukes et Schmidt (1934) ont permis de déterminer les pK de certains acides aminés dans un solvant mixte composé d'eau et d'éthanol. Par exemple pour l'arginine, le pK_{COOH} passe de 2,36 en solution aqueuse à 3,55 en solution hydroalcoolique à 70 % d'alcool, ce qui donne un delta unité de pK de 1,19. Cela démontre bien l'effet que peut avoir l'alcool sur la dissociation de composés acido-basiques.

Tableau IV.2. Liste des 20 acides aminés avec leurs pK dans une solution aqueuse. (Jukes et Schmidt (1934))

nom	formule développée	pK _{a1} (-COOH)	pK _{a2} (-NH ₂)	pK _{aR} (-R)	pI
Alanine (Ala)		2,35	9,87		6,01
Arginine (Arg)		1,82	8,99	12,48	10,76
Asparagine (Asn)		2,14	8,72		5,41
Aspartate (Asp)		1,99	9,90	3,90	2,85
Cystéine (Cys)		1,92	10,70	8,18	5,05
Glutamate (Glu)		2,10	9,47	4,07	3,15
Glutamine (Gln)		2,17	9,13		5,65
Glycine (Gly)		2,35	9,78		6,06
Histidine (His)		1,80	9,33	6,04	7,60
Isoleucine (Ile)		2,32	9,76		6,05
Leucine (Leu)		2,33	9,74		6,01
Lysine (-Lys)		2,16	9,06	10,54	9,60
Méthionine (Met)		2,13	9,28		5,74
Phénylalanine (Phe)		2,20	9,31		5,49
Proline (Pro)		1,95	10,64		6,30
Sérine (Ser)		2,19	9,21		5,68
Thréonine (Thr)		2,09	9,10		5,60
Tryptophane (Trp)		2,46	9,41		5,89
Tyrosine (Tyr)		2,20	9,21	10,46	5,64
Valine (Val)		2,39	9,74		6,00

IV.1.5. Conclusion

Les expériences exposées précédemment montrent que la variation de la composition du milieu au cours de la fermentation ne suffit pas à expliquer l'évolution du pH au cours de la fermentation alcoolique. Si la production d'éthanol peut expliquer la remontée du pH lors de la seconde phase, ni la diminution des teneurs en sucre ou de la source d'azote ni la production d'acides organiques ne permet d'expliquer la diminution du pH dans les premières heures. Cette chute de pH ne peut donc s'expliquer qu'en analysant les échanges de protons dus au métabolisme de la levure. Si comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie, les auteurs s'accordent à dire que la consommation d'une mole d'ammonium s'accompagne de la libération d'une mole de proton dans le milieu, le mécanisme induit par la consommation des acides aminés est plus incertain. Afin de discriminer différentes hypothèses, nous avons développé un modèle permettant de calculer le pH du milieu au cours de la fermentation.

IV.2. Equations du modèle du calcul du pH

Le modèle développé pour le calcul du pH comprend les trois types d'équations habituellement rencontrés dans le développement de modèles phénoménologiques en génie des procédés : des lois de conservation de la matière, des équations constitutives et des équations de contraintes. La formulation du modèle a été réfléchie de manière à faciliter la résolution du système d'équations algébriques non linéaires.

Le modèle développé est un modèle statique. A partir de la connaissance des teneurs des espèces introduites dans le milieu (sous forme non dissociées), on calcule la composition du milieu après dissociation et le pH.

IV.2.1. Notion de potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH est souvent défini, à tort, comme la mesure logarithmique de la concentration en ions hydrogène. Il a été défini pour la première fois par Sørensen en 1909 et son expression est la suivante :

$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+] \quad (\text{IV.1})$$

où $[\text{H}^+]$ représente la concentration en ions hydrogène exprimée en mole.L^{-1} de solution. Cependant, d'un point de vue théorique, le pH doit être défini comme étant l'opposé du logarithme à base 10 de l'activité des protons soit par l'expression :

$$\text{pH} = -\log_{10}(a_{\text{H}^+}) \quad (\text{IV.2})$$

où a_{H^+} est l'activité de l'ion H^+ .

En effet, dans une solution contenant d'autres types d'ions, activité et concentration sont totalement différentes. L'activité est la concentration active qui participe effectivement à la réaction plutôt que la concentration totale (vraie) des ions hydrogènes. En réalité au sein d'une solution aqueuse, il existe des interactions d'ordres électrostatiques entre les différentes espèces qui amoindrissent leur potentiel de réactivité. Les autres ions changent effectivement la concentration en ion hydrogène dans tous les processus où H^+ est impliqué.

L'équation (IV.2) peut encore s'écrire :

$$\text{pH} = -\log_{10}(m_{\text{H}^+} \times \gamma_{\text{H}^+}) \quad (\text{IV.3})$$

avec $m_{\text{H}^+} \times \gamma_{\text{H}^+} = a_{\text{H}^+}$

où m_{H^+} est la molalité en ion hydrogène exprimée en mol.kg^{-1} de solvant et γ_{H^+} le coefficient d'activité ionique de l'ion hydrogène.

Si l'utilisation des fractions molaires est nécessaire pour la définition de l'idéalité d'une solution (Denbigh, 1981), elle n'est pas adaptée au cas des électrolytes et on utilisera l'échelle des molalités, (mol.kg^{-1} de solvant), préconisée par Mullin et Söhnel (1977). La molalité présente l'avantage par rapport à la fraction molaire de ne pas nécessiter la connaissance de la masse molaire du solvant. De plus, elle est indépendante de la température, contrairement à la molarité (mol.L^{-1}) qui fait intervenir la masse volumique de la solution. L'emploi de cette méthode est partagée aussi par Erling et Richter (1999) qui préconisent l'utilisation de la molalité.

La molalité du constituant i est obtenue à partir de sa concentration massique mesurée, W_i (g.m^{-3}), de sa masse molaire M_i (g.mol^{-1}) et de la masse volumique de la solution ρ (g.m^{-3}) par la relation :

$$m_i = \frac{W_i}{\rho \times M_i} \quad (\text{IV.4})$$

Pour définir complètement le coefficient d'activité, il faut encore préciser l'état de référence, c'est-à-dire les conditions pour lesquelles il devient égal à l'unité. Dans le cas des électrolytes, il est courant de poser (Denbigh, 1981) :

Pour le solvant, $\gamma_{x_0} \rightarrow 1$ quand $x_0 \rightarrow 1$

Pour le soluté, $\gamma_{mi} \rightarrow 1$ quand $m_i \rightarrow 0$

où 0 et i sont des indices faisant référence au solvant et au soluté. En d'autres termes, les coefficients d'activités sont égaux à 1 pour les solutés à dilution infinie et pour le solvant lorsque la solution est du solvant pur.

Pour le sel $M_{v+}A_{v-}$ on définit un coefficient d'activité moyen à partir des coefficients d'activités ioniques des composants du sel :

$$\gamma_{m\pm}^v = \gamma_{m+}^{v+} \gamma_{m-}^{v-} \quad (\text{IV.5})$$

où $\gamma_{m\pm}$ est le coefficient d'activité moyen dans l'échelle des molalités ; γ_{m+}, γ_{m-} sont les coefficients d'activité ioniques des constituants du sel et v est le nombre de molécules constituant le sel. :

$$v = v_+ + v_-$$

Déterminer le pH d'une solution par calcul revient essentiellement au calcul de l'activité de l'ion H^+ , c'est-à-dire le calcul de sa molalité, de son coefficient d'activité ionique et surtout de la force ionique de la solution. Cela sous entend que tous les éléments composant la solution doivent être identifiés afin de distinguer ceux qui influencent réellement le pH. Un calcul rigoureux des proportions et des molalités de ces espèces participant à l'équilibre électrique est dès lors nécessaire.

IV.2.2. Loi de conservation de la matière

La formulation usuelle d'un modèle de réacteur consiste à écrire l'équation de conservation de matière de chaque composé présent dans la solution (Aris, 1989). Dans le cas de composés qui se dissocient en solution, il faut prendre en compte l'ensemble des formes susceptibles d'être présentes dans le milieu. Pour un mono-acide, il faudra prendre en compte la forme neutre et la forme cationique, soit deux composés en plus du proton. Pour un di-acide, 3 espèces seront à prendre en compte et pour un tri-acide, quatre espèces seront répertoriées. De la même façon, il faudra tenir compte de toutes les espèces générées par les acides aminés en solution.

Pour chacune de ces espèces, on peut écrire un bilan matière partiel. On prend en compte dans le bilan matière les n_r réactions susceptibles de se produire entre les espèces. La formulation des bilans matière retenue est celle présentée par Billardello (1993) qui introduit

les variables ζ_l pour représenter l'avancement des réactions équilibrées en les assimilant à des réactions à cinétiques rapides.

Le bilan matière s'écrit alors :

$$n_i^E - n_i^S + \sum_{l=1}^{n_r} \varpi_{i,l} \cdot \zeta_l = 0 \quad \text{pour } i = 1, n_e \quad (\text{IV.6})$$

avec :

n_i^E	: nombre de moles de l'espèce i introduites dans fermenteur	(moles)
n_i^S	: nombre de moles de l'espèce i en solution	(moles)
$\varpi_{i,l}$: coefficient stœchiométrique de l'espèce i dans l'équilibre l	(-)
ζ_l	: avancement de la réaction d'équilibre l	(moles)
n_e	: nombre d'espèces	(-)
n_r	: nombre total de réactions	(-)

Cette formulation introduit autant de variables supplémentaires (les avancements) qu'il existe d'équilibre de dissociation dans le système considéré. Or le système d'équations à résoudre est non linéaire et nécessite la mise en œuvre de méthodes numériques itératives. La difficulté de l'initialisation de ces variables constitue un inconvénient majeur de la méthode.

Nous proposons une formulation qui permet de s'affranchir de cette difficulté qui consiste à écrire les équations de conservation de matière sur les invariants du système réactionnel. Ainsi, on élimine les variables d'avancement de réaction et on facilite la tâche d'initialisation. Le sucre et l'éthanol ne posent pas de problèmes particuliers dans la mesure où ils ne se dissocient pas en solution.

IV.2.2.1. L'ammoniac

Nous pourrions raisonnablement faire l'hypothèse que l'ammoniac se trouve entièrement sous forme NH_4^+ aux pH considérés. Afin de conférer au modèle une certaine généralité, nous avons considéré l'équilibre de dissociation $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ et la conservation de l'élément invariant NH_3 . Le bilan matière est donc écrit sur cet invariant, soit :

$$m_{\text{NH}_3}^0 = m_{\text{NH}_3} + m_{\text{NH}_4^+} \quad (\text{IV.7})$$

IV.2.2.2. Les acides organiques

Dans le cas de la dissociation des acides organiques, quelque soit leur type, mono (A_IH), di ($A_{II}H_2$) ou tri ($A_{III}H_3$) acide, les radicaux A_I , A_{II} et A_{III} sont préservés. En supposant que les radicaux sont seulement impliqués dans les réactions de dissociation et donc dans le cas où l'acide ne forme pas de complexes avec les ions minéraux, les équations de conservation de la matière peuvent s'écrire :

Mono acide (A_IH): conservation du radical A_I

$$m_{A_I}^0 = m_{A_IH} + m_{A_I^-} \quad (IV.8)$$

Di acide ($A_{II}H_2$): conservation du radical A_{II}

$$m_{A_{II}}^0 = m_{A_{II}H_2} + m_{HA_{II}^-} + m_{A_{II}^{2-}} \quad (IV.9)$$

Tri acid ($A_{III}H_3$): conservation du radical A_{III}

$$m_{A_{III}}^0 = m_{A_{III}H_3} + m_{A_{III}H_2^-} + m_{A_{III}H^{2-}} + m_{A_{III}^{3-}} \quad (IV.10)$$

Cette formulation est possible pour tous les acides concernés par l'étude excepté pour l'acide tartrique susceptible de se complexer puis de cristalliser avec les ions calcium et potassium pour former du tartrate de calcium (de molalité notée m_{CaT}) et du bi tartrate de potassium (de molalité notée m_{KHT}). Dans ce cas, il faut donc prendre en compte les complexes (stables) dans la conservation de matière. On peut alors écrire :

$$m_{A_{II}}^0 = m_{A_{II}H_2} + m_{HA_{II}^-} + m_{A_{II}^{2-}} + m_{KHT} + m_{CaT} \quad (IV.11)$$

Cette équation peut s'écrire encore :

$$m_{A_{II}}^0 = m_{Tart} + m_{KHT} + m_{CaT} \quad (IV.12)$$

Avec m_{Tart} la molalité en acide tartrique non complexée mesurée en solution. On a :

$$m_{Tart} = m_{A_{II}H_2} + m_{HA_{II}^-} + m_{A_{II}^{2-}} \quad (IV.13)$$

IV.2.2.3. les acides aminés

De même que dans le cas des composés acides, on réduit le nombre de variables en utilisant les invariants de réaction. Ainsi, les espèces d'acides aminés de charge positive, de charge neutre et de charge négative sont notés respectivement A^+ et/ou A^{2+} , A^\pm , et A^- et/ou A^{2-} . De la même façon que pour les acides organiques, on peut écrire les équations de conservation des invariants de réaction.

Acide aminé mono acide/ mono base :

$$[A^{\tau}] = [A^{+}] + [A^{\pm}] + [A^{-}] \quad (\text{IV.14})$$

Acide aminé di acide/ mono base :

$$[A^{\tau}] = [A^{+}] + [A^{\pm}] + [A^{-}] + [A^{2-}] \quad (\text{IV.15})$$

Acide aminé mono acide/ di base :

$$[A^{\tau}] = [A^{+}] + [A^{\pm}] + [A^{-}] + [A^{2+}] \quad (\text{IV.16})$$

IV.2.3. Equations constitutives

IV.2.3.1. Masse volumique

La masse volumique joue un rôle dans le calcul du coefficient d'activité moyen selon la loi de Debye-Hückel (équation (IV.8)). Ethymologiquement, la masse volumique est une propriété intensive qui est définie comme le rapport de la masse d'un objet à son volume et s'exprime en kg.m^{-3} . Son expression est :

$$\rho = \frac{M}{V} \quad (\text{IV.17})$$

où M est la masse de l'objet exprimée en kg et V le volume de l'objet ou du liquide exprimé en m^3 . La masse volumique est caractéristique de chaque objet. Cependant, elle peut être influencée par la température et la nature de la solution (composition). Ainsi la masse volumique de l'eau est différente de la masse volumique d'une solution hydro-alcoolique. Dans le cas des solutions hydro-alcooliques, la densité du mélange peut être estimée par des relations empiriques (Reid et coll., 1987). Avec les valeurs issues de la thèse de Ratsimba (1990) et du Handbook of Chemical Engineers (Perry et Don Green, 1990), Gerbaud (1996) a établi une corrélation liant la valeur de la masse volumique à la température et au degré alcoolique dans le cas des vins finis.

Lorsque nous évoluons d'une solution de moût de raisins au produit final qui est le vin, nous nous trouvons en présence de trois constituants majeurs : l'eau, le sucre et l'éthanol (issu de la fermentation alcoolique). Nous devons dès lors tenir compte de la présence du sucre dans les calculs de la densité de la solution. L'équation définie par Gerbaud (1996) ne peut pas être utilisée dans notre cas. Une nouvelle corrélation est donc proposée.

Partant de la connaissance des proportions de chaque élément majoritaire (sucre, eau et alcool) de la solution hydro-alcoolique sucrée exprimées en volume, en masse ou en

concentration, le volume massique (V_M) de la solution est donc déterminé à travers cette équation :

$$V_M = \frac{V_{Total}}{M_{Eau} + M_{Sucre} + M_{Alcool}} \quad (IV.18)$$

La masse volumique (ρ) de la solution hydro-alcoolique sucrée est alors calculée par la connaissance du volume massique par la relation suivante :

$$\rho = \frac{1}{V_M} \quad (IV.19)$$

Nous avons établi une nouvelle corrélation liant la masse volumique aux teneurs en sucre et alcool à partir de données expérimentales fournies dans les tableaux 1.a et 1.b fournis en annexe. La relation est la suivante :

$$\rho = 998 + 2,8 \cdot 10^{-1} [\text{Sucre}] - 1,4 \cdot 10^{-1} \% \text{vol} \quad (IV.20)$$

où la concentration en sucre est donnée en g.L⁻¹ ou en kg m⁻³.

IV.2.3.2. Notion de force ionique

La force ionique joue un rôle central dans la théorie de Debye-Hückel qui décrit les fortes déviations à l'idéalité typiquement rencontrées dans les solutions ioniques. Elle est aussi importante pour la description de colloïdes. Dans l'échelle des molalités, la force ionique d'une solution est égale à la demi somme des produits de la molalité de tous les ions par le carré de leur électrovalence (rapport de la charge de l'ion à la charge élémentaire). Elle est exprimée en mol.kg⁻¹. Sa formule est :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i z_i^2 \quad (IV.21)$$

Où m_i est la molalité de l'élément i et z_i sa charge.

IV.2.3.3. Evaluation du coefficient d'activité

Le coefficient d'activité ionique et le coefficient d'activité moyen (IV.5) traduisent l'écart à l'idéalité d'une solution à cause de l'existence d'interactions entre les constituants de la solution. Aux interactions de faible portée (types Van Der Waals) qui concernent les particules dans le voisinage immédiat de l'ion, s'ajoute la force d'attraction entre ions qui agit à des distances beaucoup plus importantes. De surcroît les ions interagissent avec les molécules de solvant. Plus la solution est concentrée en électrolyte, moins ces interactions peuvent être négligées. Après la publication par Arrhenius en 1887 de la théorie de la

dissociation électrolytique d'un sel en ions, il faudra attendre le début du XX^{ème} siècle pour que des scientifiques, tels que Debye et Hückel, proposent des expressions permettant d'évaluer la valeur des coefficients d'activité dans des solutions d'électrolytes. Plusieurs auteurs ont fait la synthèse de ces travaux : Lewis et Randall (1961) et Zemaïtis et coll. (1986).

i. Loi de Debye-Hückel

P. Debye et E. Hückel ont développé une théorie de l'attraction entre les ions qui leur a permis d'établir une relation semi empirique tenant compte des interactions à longue distance entre les ions (attraction coulombienne) et qui décrit correctement la valeur du coefficient d'activité moyen en solution peu concentrée. Cette relation est appelée loi limite de Debye-Hückel (Harvie et coll., 1984 ; Denbigh, 1981). Dans l'échelle des molalités, elle s'écrit :

$$\log_{10} \gamma_{\pm} = -A_{DH} |z_+| |z_-| \sqrt{I} \quad (\text{IV.22})$$

Avec :

$$A_{DH} = \frac{1}{4\pi \ln 10} \left(\frac{e}{\sqrt{\epsilon} k_B T} \right)^3 \sqrt{\frac{\rho N_A}{2}}$$

I : force ionique de la solution,

N_A : nombre d'Avogadro ($6,022136 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

K_B : constante de Boltzmann ($1,380658 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

e : charge de l'électron ($1,6021177 \cdot 10^{-19} \text{ C}$)

ϵ : constante diélectrique du solvant (F.m^{-1})

ρ : masse volumique du solvant (kg.m^{-3})

Pour les électrolytes parfaitement dissociés et en solution très peu concentrée, la loi limite assimile les ions à des charges ponctuelles car les distances entre ions sont alors très supérieures aux rayons des ions. L'équation (IV.22) s'utilise pour des solutions dont la force ionique est inférieure à $0,001 \text{ mol.Kg}^{-1}$. Elle permet néanmoins de vérifier qu'un sel est parfaitement dissocié : si ce n'est pas le cas, le coefficient d'activité moyen du sel ne suit pas la loi limite de Debye-Hückel aux faibles molalités (Lewis et Randall, 1961).

Les ions ne peuvent pas s'approcher infiniment les uns des autres. Afin de prendre en compte ce phénomène, Debye et Hückel ont introduit dans leur expression un facteur, α , qui représente la distance la plus courte à laquelle l'anion, non hydraté, peut s'approcher du cation central hydraté (Stokes et Robinson 1948 ; Lewis et Randall, 1961). Les interactions

ion-ion et ion-solvant sont prises en compte par l'adjonction d'un nouveau paramètre, C_{DH} , qui traduit la réduction de la valeur de la constante diélectrique au fur et à mesure que la solution est plus concentrée. Dans l'échelle des molalités, la loi étendue de Debye-Hückel s'écrit :

$$\log_{10} \gamma_{\pm} = -A_{DH} |z_+| |z_-| \frac{\sqrt{I}}{1 + B_{DH} \alpha \sqrt{I}} + C_{DH} I \quad (IV.23)$$

$$\text{Avec } B_{DH} = \sqrt{\frac{2e^2 N_A \rho}{\epsilon k_B T}}$$

α : distance la plus courte d'approche du cation hydraté (m) (4 Å pour le cation potassium et 5 Å pour l'ion hydrogène).

C_{DH} : constante (0,055).

La loi de DEBYE-HÜCKEL (IV.8) est valable pour des valeurs de la force ionique inférieures à 0,1 mol.Kg⁻¹ et s'applique aux sels parfaitement dissociés. $\gamma_{\pm} = 0,780$ pour un électrolyte 1-1 en solution aqueuse à 25°C où la force ionique est égale à 0,1 mol.Kg⁻¹.

ii. Convention de MacInnes

L'évaluation du coefficient d'activité ionique γ_i est possible grâce à des méthodes comme celle de Pitzer. Cependant, γ_i ne peut pas être mesuré puisqu'on ne peut jamais trouver en solution un ion esseulé sans d'autres ions de charge opposée qui neutralisent sa charge. Il est donc nécessaire de faire des hypothèses. En particulier, il existe la convention de MacInnes selon laquelle le coefficient d'activité de l'ion Cl^- dans une solution est égal au coefficient d'activité moyen de KCl dans une solution de même force ionique et de même solvant (Harvie et coll., 1984 ; Denbigh, 1981). On définit alors n'importe quel coefficient d'activité ionique par rapport à cette convention en le multipliant par le rapport de γ_{Cl^-} et de $\gamma_{\pm, KCl}$ calculés à la même force ionique que dans la solution considérée.

$$\gamma_{i, \text{corrigé}} = \gamma_i \frac{\gamma_{Cl^-}}{\gamma_{\pm, KCl}} \quad (IV.24)$$

Par exemple, le coefficient d'activité ionique de H^+ qui sert à calculer le pH s'exprime de la manière suivante :

$$\gamma_{H^+, \text{MacInnes}} = \gamma_{H^+} \frac{\gamma_{Cl^-}}{\gamma_{\pm, KCl}} = \frac{\gamma_{\pm, HCl}^2}{\gamma_{\pm, KCl}} \quad (IV.25)$$

Les valeurs de $\gamma_{H^+, MacInnes}$, peuvent être très différentes puisqu'elles dépendent de la force ionique de la solution. Dans le vin, ne pas prendre en compte $\gamma_{H^+, MacInnes}$ peut conduire à une erreur de la molalité en ions H^+ de 30%, ce qui correspond à une erreur du pH de 0,15 unité (Gerbaud, 1996).

IV.2.3.4. Constante diélectrique

Selon Abolghasem J. et coll. (2004), la constante diélectrique est une propriété physique qui est influencée par des attractions interatomiques et intermoléculaires. C'est une mesure du solvant qui renseigne sur l'état de solubilité et de dissociation des éléments le composant. Ainsi, un solvant avec une forte constante diélectrique encourage une importante dissociation des électrolytes. Tandis qu'une faible constante diélectrique entraîne la formation de couple d'ions (Day et Underwood, 1991). La connaissance de la constante diélectrique d'un solvant mixte peut expliquer l'état de dissociation des acides présents dans le système. Tout comme la masse volumique, la constante diélectrique est un important paramètre dans le calcul du coefficient d'activité moyen.

On distingue la constante diélectrique absolue (dans la loi de Debye-Hückel) et la constante diélectrique relative. Les deux termes sont liés par la relation suivante :

$$\varepsilon = \varepsilon_r \times \varepsilon_0 \quad (IV.26)$$

ε : constante diélectrique absolue ($F.m^{-1}$)

ε_r : constante diélectrique relative (sans unité)

ε_0 : la permittivité du vide ($8,854187.10^{-12} F.m^{-1}$)

La constante diélectrique relative, ε_r , permet de caractériser un solvant (RENON, 1986). La méthode de calcul de la constante diélectrique relative d'un solvant mixte peut être évaluée à partir des travaux de Decroocq (1964), de Prakongpan et Nagai (1984), Chien (1984) et de Dumanovic et coll. (1992). Elle varie linéairement en fonction des fractions en volume (ou en concentration) des différents constituants du mélange :

$$\varepsilon_r = \sum_i \varepsilon_{ri} Y_i \quad (IV.27)$$

ε_{ri} : constante diélectrique relative du composé i

Y_i : fraction volumique du composé i

Elle est valable pour des composés possédant des constantes diélectriques supérieures à 5. Par exemple pour un mélange à 25°C constitué de 89,8%vol eau ($\epsilon_r = 78,54$) 10%vol éthanol ($\epsilon_r = 24,3$) et 0,2%vol glycérol ($\epsilon_r = 42,5$) la constante diélectrique relative est égale à 73,04.

Timmermans (1960) a établi la relation calculant la valeur de la constante diélectrique dans une solution hydro-alcoolique. C'est une fonction qui dépend de la température et du degré alcoolique :

$$\epsilon = (87,605 - 0,389 (\%vol) - 0,00245 (\%vol)^2 + (-0,3937 - 0,00229 (\%vol)^2 + 5,4 \cdot 10^{-5} (\%vol)^2) T + (8,65 \cdot 10^{-4} + 3,16 \cdot 10^{-5} (\%vol)^2 - 4,1 \cdot 10^{-7} (\%vol)^2) T^2) / 1,12884 \cdot 10^{-2} \quad (IV.28)$$

Où T , la température en Kelvin, %vol, le degré alcoolique

Les paramètres de la fonction ont été identifiés entre 0 et 40°C, et 0 et 40 %vol, l'erreur absolue est inférieure à 0,1 unité, voire inférieure à 0,05 pour le domaine 0-12 %vol.

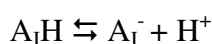
Cette relation ne concerne que les solutions hydro-alcooliques types vins ne contenant pas de sucre. Dans la mesure où la fermentation alcoolique part d'une solution sucrée (moûts de raisins) pour aboutir à une solution probablement pauvre en sucre, il est impératif de tenir compte de la concentration en sucre dans l'expression de la constante diélectrique de la solution. En partant de la relation décrite par Renon (1986), Dumanovic et coll. (1992), une nouvelle corrélation est établie pour un solvant ternaire comprenant l'eau, le sucre et l'alcool. Les constantes diélectriques relatives de ces composants (eau, glucose et éthanol) tirées du Handbook of Chemistry and Physics 1999-2000, sont à 20°C. A partir des données expérimentales (tableau 1.a donné en annexe), nous avons déterminé les proportions de chaque élément dans le moût. La constante diélectrique absolue du mélange a été déterminée (tableau 1.b de l'annexe). En multipliant cette valeur par ϵ_0 , la constante diélectrique relative est obtenue. La relation est la suivante :

$$\epsilon = (71,48 + 3,21 \cdot 10^{-2} [\text{sucre}] - 0,127 \%vol) \epsilon_0 \quad (IV.29)$$

IV.2.3.5. Constantes de dissociation des acides organiques

Les acides organiques présents dans le milieu sont susceptibles de se dissocier. Suivant le caractère acide du composé (mono, di ou tri acide), il peut induire de un à trois équilibres de dissociation.

Pour un mono acide, noté A_IH , on aura l'équilibre suivant :



régi par la constante d'équilibre $K_{1A_I} = \frac{a_{H^+} a_{A_I^-}}{a_{A_IH}}$

Pour un di-acide, noté $A_{II}H_2$ on aura deux équilibres de dissociation :



régis par les deux constantes de dissociation $K_{1A_{II}} = \frac{a_{A_{II}H^-} a_{H^+}}{a_{A_{II}H_2}}$ et $K_{2A_{II}} = \frac{a_{A_{II}^{2-}} a_{H^+}}{a_{A_{II}H^-}}$

respectivement.

Enfin pour un tri-acide, noté $(A_{III}H_3)$, trois équilibres de dissociation devront être pris en compte:



régis par les constantes $K_{1A_{III}} = \frac{a_{A_{III}H_2^-} a_{H^+}}{a_{A_{III}H_3}}$, $K_{2A_{III}} = \frac{a_{A_{III}H^{2-}} a_{H^+}}{a_{A_{III}H_2^-}}$ et

$$K_{3A_{III}} = \frac{a_{A_{III}^{3-}} a_{H^+}}{a_{A_{III}H^{2-}}}$$

Les valeurs des constantes de dissociations des acides organiques évoluent avec les caractéristiques du milieu. Elles dépendent de la température et surtout de la concentration en alcool du milieu. Des études orientées dans ce sens ont été réalisées par Usseglio-Tomasset et Bosia (1978). Ces auteurs ont établi des corrélations reliant les valeurs des constantes de dissociation des acides au degré alcoolique (%vol) de la solution. Ces corrélations sont établies à 20°C. Ainsi, les constantes de dissociation sont calculées comme une fonction polynomiale dépendant du degré alcoolique :

$$pK = p_0 + p_1 \times (^\circ\text{alc}) + p_2 \times (^\circ\text{alc})^2 \quad (\text{IV.30})$$

Les valeurs de p_0 , p_1 et p_2 , sont reportées dans le tableau IV.3 pour chaque acide concerné par notre étude.

Tableau IV.3. Paramètres de calcul de coefficients de dissociation d'acides organiques. T=20°C dans une solution eau-alcool, ** T=25°C dans l'eau (Usseglio-Tomasset and Bosia, 1978)

Acides	Formule semi-développée	K ₁			K ₂			K ₃		
		P ₀	P ₁	P ₂	P ₀	P ₁	P ₂	P ₀	P ₁	P ₂
Lactique	CH ₃ COH-COOH	3,89	1,21 10 ⁻²	1,5 10 ⁻⁴						
acétique	CH ₃ COOH	4,76	7,96 10 ⁻³	2,88 10 ⁻⁴						
pyruvique	CH ₃ COCOOH	2,72	7,0 10 ⁻³	1,61 10 ⁻⁴						
malique	COOH-CH ₂ -CHOH- COOH	3,47	1,19 10 ⁻²	1,53 10 ⁻⁴	5,10	1,70 10 ⁻²	1,09 10 ⁻⁴			
succinique	COOH-CH ₂ -CH ₂ - COOH	4,21	1,24 10 ⁻²	1,76 10 ⁻⁴	5,63	1,35 10 ⁻²	2,83 10 ⁻⁴			
citrique	COOH-CH-C(OH)(COOH)- CH-COOH	3,15	1,17 10 ⁻²	1,76 10 ⁻⁴	4,72	1,68 10 ⁻²	4,0 10 ⁻⁶	6,41 **	0	0

Pour les complexes de bitartrate de potassium et de tartrate de calcium, *KHT* et *CaT*, les coefficients de dissociations sont respectivement de 10^{-1,33} et 10⁻² (Gerbaud, 1996).

IV.2.4. Equations de contraintes

Les équations de contraintes du modèle comprennent les équations d'équilibre chimique et l'équation d'électroneutralité de la solution.

IV.2.4.1. Equations d'équilibres chimiques

i. Acides organiques

Les molalités des espèces A_IH, A_I⁻, A_{II}H₂, A_{II}H⁻, A_{II}²⁻, A_{III}H₃, A_{III}H₂⁻, A_{III}H²⁻, A_{III}³⁻ dans la solution peuvent être écrites explicitement en fonction de la molalité de l'ion H⁺ et du coefficient d'activité moyen provenant de la conservation de matière et des expressions des constantes d'équilibres chimiques. Nous avons :

Mono acide (A_IH):

$$K_{1A_I} = \frac{a_{H^+} a_{A^-}}{a_{AH}} = \frac{m_{H^+} m_{A^-} \gamma_{\pm,1:1}^2}{m_{AH} \gamma_{A_I H}} \quad (IV.31)$$

Di acide (A_{II}H₂):

$$K_{1A_{II}} = \frac{a_{A_{II}H^-} a_{H^+}}{a_{A_{II}H_2}} = \frac{m_{A_{II}H^-} m_{H^+} \gamma_{\pm,1:1}^2}{m_{A_{II}H_2} \gamma_{A_{II} H_2}} \quad (IV.32)$$

$$K_{2A_{II}} = \frac{a_{A_{II}^{2-}} a_{H^+}}{a_{A_{II}H^-}} = \frac{m_{A_{II}^{2-}} m_{H^+} \gamma_{\pm,2:1}^3}{m_{A_{II}H^-} \gamma_{\pm,1:1}^2} \quad (IV.33)$$

Tri acide (A_{III}H₃):

$$K_{1A_{III}} = \frac{a_{A_{III}H_2^-} a_{H^+}}{a_{A_{III}H_3}} = \frac{m_{A_{III}H_2^-} m_{H^+} \gamma_{\pm,1:1}^2}{m_{A_{III}H_3} \gamma_{A_{III} H_3}} \quad (IV.34)$$

$$K_{2A_{III}} = \frac{a_{A_{III}H^{2-}} a_{H^+}}{a_{A_{III}H_2^-}} = \frac{m_{A_{III}H^{2-}} m_{H^+} \gamma_{\pm,2:1}^3}{m_{A_{III}H_2^-} \gamma_{\pm,1:1}^2} \quad (IV.35)$$

$$K_{3A_{III}} = \frac{a_{A_{III}^{3-}} a_{H^+}}{a_{A_{III}H^{2-}}} = \frac{m_{A_{III}^{3-}} m_{H^+} \gamma_{\pm,3:1}^4}{m_{A_{III}H^{2-}} \gamma_{\pm,2:1}^3} \quad (IV.36)$$

ii. Les acides aminés

Les contraintes d'équilibre de dissociation des acides aminés sont écrits dans le modèle en concentration, puisque les seules données dont nous disposions étaient données en concentrations (tableau IV.2). K_{COOH} , K_R et K_{NH2} sont respectivement le coefficient de dissociation du groupement acide, du radical et du groupement basique. On a :

Acide aminé mono acide/ mono base :

$$K_{COOH} = \frac{[A^\pm] \times [H^+]}{[A^+]} \quad (IV.37)$$

$$K_{NH_2} = \frac{[A^-] \times [H^+]}{[A^\pm]} \quad (IV.38)$$

Acide aminé di acide/ mono base

$$K_{COOH} = \frac{[A^\pm] \times [H^+]}{[A^+]} \quad (IV.39)$$

$$K_R = \frac{[A^-] \times [H^+]}{[A^\pm]} \quad (\text{IV.40})$$

$$K_{NH_2} = \frac{[A^{2-}] \times [H^+]}{[A^-]}$$

Acide aminé mon acide/ di base :

$$K_{COOH} = \frac{[A^+] \times [H^+]}{[A^{2+}]} \quad (\text{IV.41})$$

$$K_R = \frac{[A^\pm] \times [H^+]}{[A^+]} \quad (\text{IV.42})$$

$$K_{NH_2} = \frac{[A^-] \times [H^+]}{[A^\pm]} \quad (\text{IV.43})$$

Cas spécifique d la tyrosine

$$K_{COOH} = \frac{[A^\pm] \times [H^+]}{[A^+]} \quad (\text{IV.44})$$

$$K_{NH_2} = \frac{[A^-] \times [H^+]}{[A^\pm]} \quad (\text{IV.45})$$

$$K_R = \frac{[A^{2-}] \times [H^+]}{[A^-]} \quad (\text{IV.46})$$

iii. Dissociation de l'eau

L'équilibre de dissociation de l'eau $H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$ est également considéré.

$$K_w = m_{OH^-} \cdot m_{H^+} \quad (\text{IV.47})$$

Avec :

$$K_w = 10^{(-14,939 - 0,041703 \times T + 1,6249 \cdot e^{-4 \times T^2})}$$

IV.2.4.2. Electroneutralité d'une solution

Une solution est électriquement neutre lorsqu'il y a autant d'anions et de cations ; ce qui sous entend que la somme des cations ou ions positifs est équivalente à la somme des anions ou ions négatifs. L'expression mathématique est la suivante :

$$\sum(+) = \sum(-) \quad (\text{IV.48})$$

Où $\sum(+)$ est la somme des cations et $\sum(-)$ la somme des anions. Cette équation peut s'écrire de la manière suivante :

$$\sum_{i=1}^{n_electrolytes} m_i(m_{H^+}, I) z_i = 0 \quad (\text{IV.49})$$

Où m est la molalité de l'espèce i de charge z

IV.3. Formulation et résolution du modèle

IV.3.1. Formulation du modèle

Un certain nombre de variables peuvent être calculées explicitement à partir de la connaissance de la teneur en proton et de la force ionique. Ainsi, hormis pour l'acide tartrique susceptible de former des complexes, les molalités des différents acides organiques ou aminés s'expriment de manière explicite en fonction de la molalité en proton, de la force ionique de la solution (m_{H^+} et I) à partir des bilans matière et des équations d'équilibre.

Elles sont recensées dans le tableau IV.4. Elles constituent un ensemble de fonctions explicites, noté $m_i(m_{H^+}, I)$.

Tableau IV.4 : variables explicites en m_{H^+} et I

Equation	N°	Expression
Masse volumique	IV.20	$\rho = 0,998 + 2,8 \cdot 10^{-4} [\text{Sucre}] - 1,4 \cdot 10^{-3} \cdot \text{alc}$
Molalité initiale	IV.4	$m_i = \frac{W_i}{\rho \times M_i}$
Constante d'équilibre	IV.30	$pK_a = p_0 + p_1 \times (\text{alc}) + p_2 \times (\text{alc})^2$
Constante diélectrique	IV.29	$\epsilon = (71,48 + 3,21 \cdot 10^{-2} [\text{sucre}] - 0,127 \cdot \text{alc}) \cdot \epsilon_0$
Coefficient d'activité	IV.23	$\log_{10} \gamma_{\pm} = -A_{DH} z_+ z_- \frac{\sqrt{I}}{1 + B_{DH} \alpha \sqrt{I}} + C_{DH} I$ $A_{DH} = \frac{1}{4\pi \ln 10} \left(\frac{e}{\sqrt{\epsilon} k_B T} \right)^3 \sqrt{\frac{\rho_0 N_A}{2}} \quad \text{et} \quad B_{DH} = \sqrt{\frac{2e^2 N_A \rho_0}{\epsilon k_B T}}$
Molalités des mon acides	IV.50	$m_{A_i^-} = \frac{m_{AH}^0}{1 + \frac{m_{H^+} \gamma_{\pm, H:A}^2}{K_{1A_i}}}$
	IV.51	$m_{A_iH} = m_{A_i}^0 - m_{A_i^-}$
Molalités des di acides	IV.52	$m_{A_{II}H^-} = \frac{m_{A_{II}H_2}^0}{1 + \frac{K_{2A_{II}} \gamma_{\pm, H:HA}^2}{m_{H^+} \gamma_{\pm, H_2:A}^3} + \frac{m_{H^+} \gamma_{\pm, H:HA}^2}{K_{1A_{II}}}}$
	IV.53	$m_{A_{II}^{2-}} = \frac{m_{A_{II}H^-} \times K_{2A_{II}} \times \gamma_{\pm, l}^2}{m_{H^+} \times \gamma_{\pm, 2:l}^3}$
	IV.4	$m_{A_{II}H_2} = m_{A_{II}}^0 - m_{A_{II}H^-} - m_{A_{II}^{2-}}$

Equation	N°	Expression
Molalités des tri acides	IV.55	$m_{H_2A^-} = \frac{m_{H_3A}^0}{\left[1 + \frac{m_{H^+} \times \gamma_{\pm 1:1}^2}{K_{1A_{III}}} + \frac{K_{2A_{III}} \times \gamma_{\pm 1:1}^2}{m_{H^+} \times \gamma_{\pm 2:1}^3} + \frac{K_{2A_{III}} \times K_{3A_{III}} \times \gamma_{\pm 1:1}^2}{m_{H^+}^2 \times \gamma_{\pm 3:1}^4} \right]}$
	IV.56	$m_{HA^{2-}} = \frac{m_{H_3A}^0}{\left[1 + \frac{m_{H^+} \times \gamma_{\pm 2:1}^3}{K_{2A_{III}} \times \gamma_{\pm 1:1}^2} + \frac{m_{H^+}^2 \times \gamma_{\pm 2:1}^3}{K_{2A_{III}} K_{1A_{III}}} + \frac{K_{3A_{III}} \times \gamma_{\pm 2:1}^3}{m_{H^+} \times \gamma_{\pm 3:1}^4} \right]}$
	IV.57	$m_{A^{3-}} = \frac{m_{H_3A}^0}{\left[1 + \frac{m_{H^+} \gamma_{\pm, H_2:HA}^4}{K_{3A_{III}} \gamma_{\pm, H_2:HA}^3} + \frac{m_{H^+}^2 \gamma_{\pm, H_3:A}^4}{K_{2A_{III}} K_{3A_{III}} \gamma_{\pm, H_2:A}^2} + \frac{m_{H^+}^3 \gamma_{\pm, H_3:A}^4}{K_{1A_{III}} K_{2A_{III}} K_{3A_{III}} \gamma_{\pm, H_3:A}} \right]}$
	IV.58	$m_{A_{II}H_2} = m_{A_{II}}^0 - m_{HA_{II}^-} - m_{A_{II}^{2-}}$
Molalités des acides aminés mono acide mono amine	IV.59	$[A^\pm] = \frac{K_{COOH} \times [A]_0}{[H^+] + K_{COOH} + \frac{K_{COOH} \times K_{NH_2}}{[H^+]}}$
	IV.60	$[A^-] = \frac{K_{NH_2} \times [A^\pm]}{[H^+]}$
	IV.61	$[A^+] = \frac{[A^\pm] \times [H^+]}{K_{COOH}}$
Molalités des acides aminés di acide mono amine	IV.62	$[A^{2-}] = \frac{[A]_0}{1 + \frac{[H^+]}{K_{NH_2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{NH_2} \times K_R} + \frac{[H^+]^3}{K_{NH_2} \times K_{COOH} \times K_R}}$
	IV.63	$[A^-] = \frac{[A^{2-}] \times [H^+]}{K_{NH_2}}$
	IV.64	$[A^\pm] = \frac{[A^{2-}] \times [H^+]^2}{K_{NH_2} \times K_R}$
	IV.65	$[A^+] = \frac{[A^{2-}] \times [H^+]^3}{K_{NH_2} \times K_R \times K_{COOH}}$

Equation	N°	Expression
Molalités des acides aminés mono acide di amine	IV.66	$[A^-] = \frac{[A]_0}{1 + \frac{[H^+]}{K_{NH2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{NH2} \times K_R} + \frac{[H^+]^3}{K_{NH2} \times K_{COOH} \times K_R}}$
	IV.67	$[A^\pm] = \frac{[A^-] \times [H^+]}{K_{NH2}}$
	IV.68	$[A^+] = \frac{[A^-] \times [H^+]^2}{K_{NH2} \times K_R}$
	IV.69	$[A^{2+}] = \frac{[A^-] \times [H^+]^3}{K_{NH2} \times K_R \times K_{COOH}}$
Cas spécifique de la tyrosine	IV.70	$[A^{2-}] = \frac{[A]_0}{1 + \frac{[H^+]}{K_R} + \frac{[H^+]^2}{K_{NH2} \times K_R} + \frac{[H^+]^3}{K_{NH2} \times K_{COOH} \times K_R}}$
	IV.71	$[A^\pm] = \frac{[A^{2-}] \times [H^+]^2}{K_{NH2} \times K_R}$
	IV.72	$[A^+] = \frac{[A^{2-}] \times [H^+]^3}{K_{NH2} \times K_R \times K_{COOH}}$
	IV.73	$[A^-] = \frac{[A^{2-}] \times [H^+]}{K_R}$
Molalité en OH ⁻	IV.47	$m_{OH^-} = \frac{K_w}{m_{H^+}}$

En supposant que les seules réactions de complexation possibles sont celles de l'acide tartrique avec le calcium et le potassium, il faut considérer 9 équations supplémentaires à 9 inconnues (tableau IV.5): l'estimation de la force ionique, l'équation d'électroneutralité, l'équations de la molalité d'acide tartrique non complexé, l'équation de la molalité de la première forme de dissociation de l'acide tartrique ainsi que celle de la deuxième forme, l'équation de la molalité de bitartrate de potassium ainsi que du tartrate de calcium, l'équation de la molalité de calcium ainsi que du potassium. Les 9 inconnues du problème à résoudre sont : m_{H^+} , I , A_{TAR} , $m_{TAR_{II}H^-}$, $m_{TAR_{II}^{2-}}$, m_{KHT} , m_{CaT} , m_{POT} , m_{Cal}

Cette formulation facilite l'initialisation de la procédure itérative de Newton-Raphson (Carnahan et al. 1969) utilisée pour résoudre le problème.

Tableau IV.5 : système d'équations à résoudre. Les fonctions $m_i(m_{H^+}, I)$ sont consignées dans le tableau IV.4.

équation	N°	expression
Molalité acide tartrique non complexé	IV.13	$m_{TAR} = m_{TAR}^0 - m_{kht} - m_{CaT}$
Molalité du bitartrate	IV.74	$m_{TAR_{II}H^-} = \frac{m_{TAR}}{1 + \frac{K_{2TAR_{II}} \gamma_{\pm, H:HA}^2}{m_{H^+} \gamma_{\pm, H_2:A}^3} + \frac{m_{H^+} \gamma_{\pm, H:HA}^2}{K_{1TAR_{II}}}}$
Molalité du tartrate	IV.75	$m_{TAR_{II}^{2-}} = \frac{m_{TAR_{II}H^-} \times K_{2TAR_{II}} \times \gamma_{\pm 1:1}^2}{m_{H^+} \times \gamma_{\pm 2:1}^3}$
Molalité en bitartrate de potassium	IV.76	$m_{KHT} = \frac{m_{POT} \times m_{TAR_{II}H^-} \times \gamma_{\pm 1:1}^2(KHT)}{10^{-1,33}}$
Molalité en tartrate de calcium	IV.77	$m_{CaT} = \frac{m_{CAL} \times m_{TAR_{II}^{2-}} \times \gamma_{\pm 1:1}^2(KHT)}{10^{-2}}$
Molalité du potassium	IV.78	$m_K = m_K^0 - m_{KHT}$
Molalité du calcium	IV.79	$m_{Ca} = m_{Ca}^0 - m_{CaT}$
Electroneutralité	IV.49	$\sum_{i=1}^{n_{electrolytes}} m_i(m_{H^+}, I) z_i = 0$
Force ionique	IV.21	$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i z_i^2$

IV.3.2. Méthode de résolution et diagramme du modèle

Souvent le pH des milieux synthétiques est ajusté avec une solution de soude avant le démarrage de la fermentation. Dans ce cas, la molalité de soude ajoutée est introduite dans le modèle pour que le pH initial mesuré après ajustement soit égal au pH initial calculé. Dans le cas particulier des moûts naturels où tous les composants ne peuvent pas être totalement dosés (cas des anions minéraux), le pH initial calculé est toujours supérieur au pH initial mesuré. Pour calibrer le pH, nous introduisons donc le concept d'anions (par exemple le sulfate et le chlorure) qui manqueraient au dosage. La molalité m_{Anion} de ces anions est par la suite considérée comme constante tout au long du processus de simulation du pH. Cela signifie que nous faisons l'hypothèse qu'ils n'interviennent pas dans les réactions de fermentation. Dans le diagramme qui suit, nous essayons de montrer les principales étapes de la résolution du modèle.

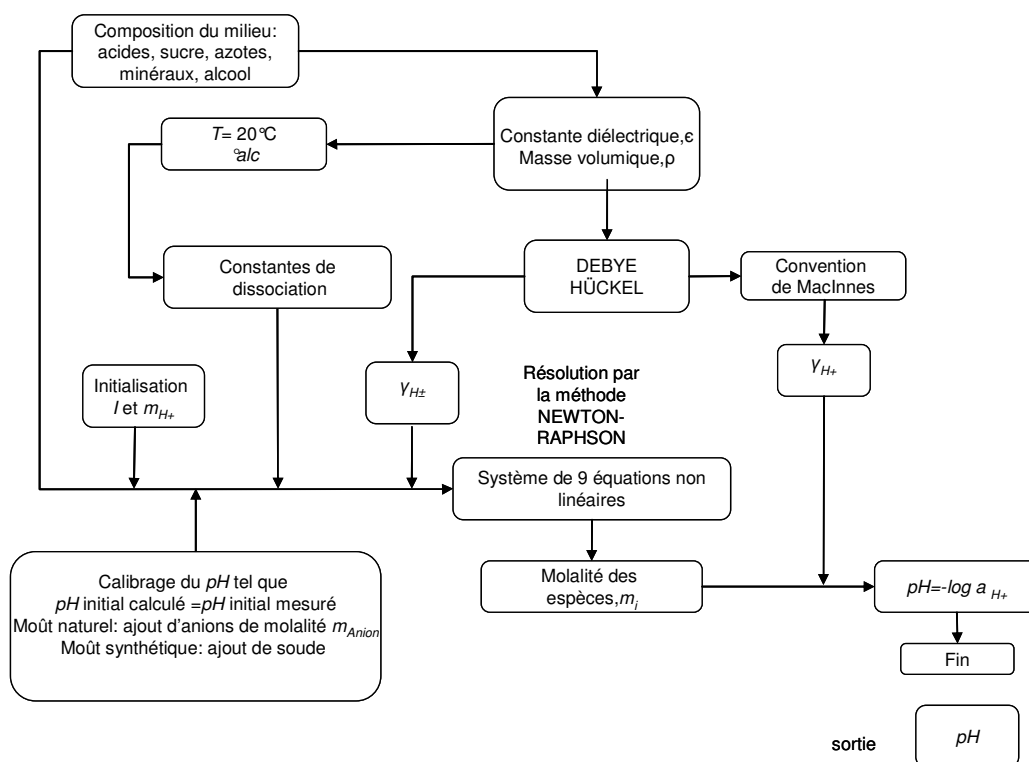


Figure IV.6. Diagramme de calcul du pH de moûts synthétiques et naturels

IV.4. Validation du modèle

Après développement et codage du modèle en langage fortran, nous avons procédé aux tests de validation. Les pH de milieux sont mesurés expérimentalement puis calculés avec le modèle. D'autre part, nous avons ajouté des composés à différentes concentrations (acide, alcool) à un moût de raisin. Les pH expérimentaux sont mesurés et calculés également avec le modèle.

IV.4.1. Simulation du pH de milieux synthétiques composés

Les milieux sont composés de sucre (glucose), d'acides organiques (acide malique, citrique et tartrique) et de minéraux. Nous disposons de quatre types de milieux synthétiques (MSA, MSB, MSC, et MSD) qui se différencient par la concentration en alcool et en acide tartrique (tableau IV.6).

Tableau IV.6. Comparaison pH expérimentaux et calculés de différents milieux synthétiques

Composants	Différents types de milieux synthétiques (MS)			
	MSA	MSB	MSC	MSD
Glucose (g/L)	200	200	200	200
Acide citrique, H ₂ O (g/L)	1,518	1,553	1,54	1,528
Acide malique (g/L)	6,067	6,085	6,024	6,024
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0,269	0,26	0,268	0,266
CaCl ₂ (g/L)	0,252	0,235	0,233	0,253
NaCl (g/L)	0,214	0,228	0,212	0,234
Ethanol (%)	0	6%	12%	0
Acide tartrique (g/L)	0	0	0	4,269
pH mesuré (m _{H+})	2,35 ± 0,05	2,4 ± 0,05	2,43 ± 0,05	2,14 ± 0,05
pH calculé par le modèle	2,371	2,405	2,447	2,186
Erreur relative	0,015	0,004	0,012	0,033

Ainsi, les milieux MSA, MSB et MSC en plus des autres composants, contiennent respectivement 0, 6 et 12 % vol. d'éthanol avec 0 g.L⁻¹ en acide tartrique. Le milieu MSD, en revanche contient de l'acide tartrique mais pas d'alcool. Les pH mesurés et calculés par le modèle sont consignés dans le tableau IV.6.

Le pH expérimental et calculé sont presque identiques quelque soit le milieu. Les erreurs relatives dans les différents cas, sont extrêmement faibles. Le modèle semble bien simuler les pH des milieux composés ; ce qui sous entend que les différents paramètres de calculs et les hypothèses émises sont bien intégrées.

Après ces tests en milieux synthétiques, nous envisageons de réaliser des tests en condition réelle, c'est-à-dire utiliser comme milieu le moût de raisins blancs dans lequel on ajoute de l'alcool ou de l'acide à différentes concentrations.

IV.4.2. Ajout de composés à différentes concentrations sur moût réel

Comme déjà souligné plus haut, ces tests d'ajout de composés sont concentrés sur l'éthanol et l'acide succinique en ce sens que ce sont les deux principaux produits de la fermentation alcoolique dans leur catégorie et ont été identifiés comme composés influençant le pH. Les pH expérimentaux sont comparés aux pH calculés par le modèle.

IV.4.3. Ethanol : Comparaison pH mesuré et simulé

On a vu dans le chapitre précédent que le pH du milieu augmente avec la concentration en éthanol. En plus des éléments composant le moût, la concentration en éthanol est entrée dans le modèle. A chaque variation de la concentration en éthanol, le pH est calculé et comparé au pH expérimental. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.7. De manière générale, le pH calculé par le modèle augmente avec l'augmentation de la concentration en alcool. Les deux courbes ont la même allure et chaque point expérimental du pH est quasi identique à celui calculé avec le modèle. Par ailleurs, on pourra remarquer un léger décalage mais non significatif (précision pH : 0,05) entre le pH expérimental et le pH calculé quand la concentration en alcool devient plus importante. On peut dire finalement que l'évolution du pH expérimental en fonction de l'alcool est bien représentée par calcul avec le modèle.

Tableau IV.7. Comparaison du pH expérimental et simulé par le modèle en fonction de la concentration en éthanol

% vol.	Valeur pH expérimental	valeur pH calculé	Erreur relative sur le pH (%)	Erreur relative sur m_{H^+} (%)
0	3,29	3,29	0,0	0,0
2	3,315	3,315	0,0	0,0
6	3,375	3,37	0,15	1,14
12	3,47	3,462	0,23	1,83

IV.4.4. Acides organiques : Comparaison pH mesuré et simulé

Nous venons de voir que le modèle représente bien l'évolution du pH en fonction de la concentration en alcool. Qu'en est-il des acides organiques ?

Comme dans le test d'influence de composés sur le pH, nous avons utilisé les mêmes variables (concentration en acide succinique à différentes concentrations en éthanol). Ces variables sont introduites dans le modèle pour le calcul du pH. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.8.

Tableau IV.8 Comparaison du pH expérimental et simulé par le modèle en fonction de la concentration en acide succinique à 0 et à 12% d'éthanol.

$C_{\text{acide succinique}}$	% vol.	Valeur pH expérimental	valeur pH calculé	Erreur relative sur le pH (%)	Erreur relative sur le m_{H^+} (%)
0	0	3,29	3,29	0	0
0.233		3,29	3,282	0,24	1,8
0.411		3,29	3,277	0,39	2,9
0.833		3,28	3,264	0,48	3,6
0	12	3,47	3,462	0,23	1,83
0.232		3,47	3,455	0,43	3,39
0.411		3,47	3,449	0,6	4,72
0.83		3,46	3,436	0,69	5,37

Dans la gamme de concentration d'acide succinique testée, nous avons une évolution similaire des pH expérimentaux et calculés. Les pH expérimentaux sont bien représentés par le modèle. Cependant, il faut remarquer qu'à 0% d'éthanol, nous avons une meilleure représentation du pH expérimental qu'à 12% d'éthanol. On observe un léger décalage entre le pH calculé et expérimental qui reste tout de même dans la marge d'erreur de l'appareil de mesure du pH ($\pm 0,05$).

IV.5. Conclusion

Nous avons montré au début de ce chapitre que l'évolution seule des concentrations des différents constituants du milieu de fermentation ne permettait pas d'expliquer l'évolution de pH observée au cours de la fermentation. Plus particulièrement la première phase de diminution de pH reste inexpliquée. Afin de tester différentes hypothèses, un modèle de calcul de pH a été développé et codé en fortran. Pour cela des corrélations permettant de calculer certaines propriétés physico-chimiques d'une solution hydro-alcoolique sucrée ont été établies. L'écriture du modèle a été particulièrement soignée de manière à rendre sa résolution la plus aisée possible en particulier pour l'initialisation des variables. Le modèle a été validé avec succès sur des solutions synthétiques à composition parfaitement maîtrisée puis sur le moût de raisin supplémenté en acide organique et éthanol.

V. Application du modèle de calcul du pH

Dans le but de tester le modèle de calcul du pH du chapitre précédent, nous avons réalisé quatre fermentations alcooliques : 3 sur milieux synthétiques, 1 sur moût naturel de raisins blancs. L'analyse bibliographique a montré que le métabolisme azoté jouait un rôle essentiel sur l'évolution du pH en cours de fermentation. La consommation de l'ammonium par les levures notamment est réputée entraîner une chute du pH. Si les phénomènes d'échange de protons liés à l'assimilation du NH_4^+ semblent bien connus, ils apparaissent beaucoup plus discutés en ce qui concerne l'assimilation des acides aminés. Afin d'évaluer expérimentalement l'impact de l'assimilation des matières azotées sur le pH, la source azotée de milieux synthétiques a été modifiée: NH_4^+ seuls, acides aminés seuls, mélange de NH_4^+ et d'acides aminés. Plusieurs hypothèses concernant l'effet de l'assimilation des acides aminés sur le pH ont pu alors être introduites dans le modèle et confrontées aux résultats expérimentaux obtenus. Ceci permet alors de les valider ou de les invalider. Au final, une fermentation de validation sur moût naturel de raisins blancs a été effectuée.

V.1. Fermentation sur moût synthétique avec NH_4^+ comme seule source azotée

Dans cette fermentation dont la composition du milieu est présentée dans le chapitre matériels et méthodes, nous nous intéressons à l'évolution des composés et plus particulièrement des acides organiques produits, de l'éthanol et surtout de l'évolution de la source azotée qui est exclusivement de l'ammonium. Dans cette expérience, la fermentation a été volontairement arrêtée en fin de phase de croissance exponentielle de la biomasse pour des raisons pratiques (durée limitée de la fermentation). Ceci n'est pas gênant pour l'exploitation des données dans la mesure où à ce temps là, tout l'ammonium est déjà consommé.

V.1.1. Résultats et discussion

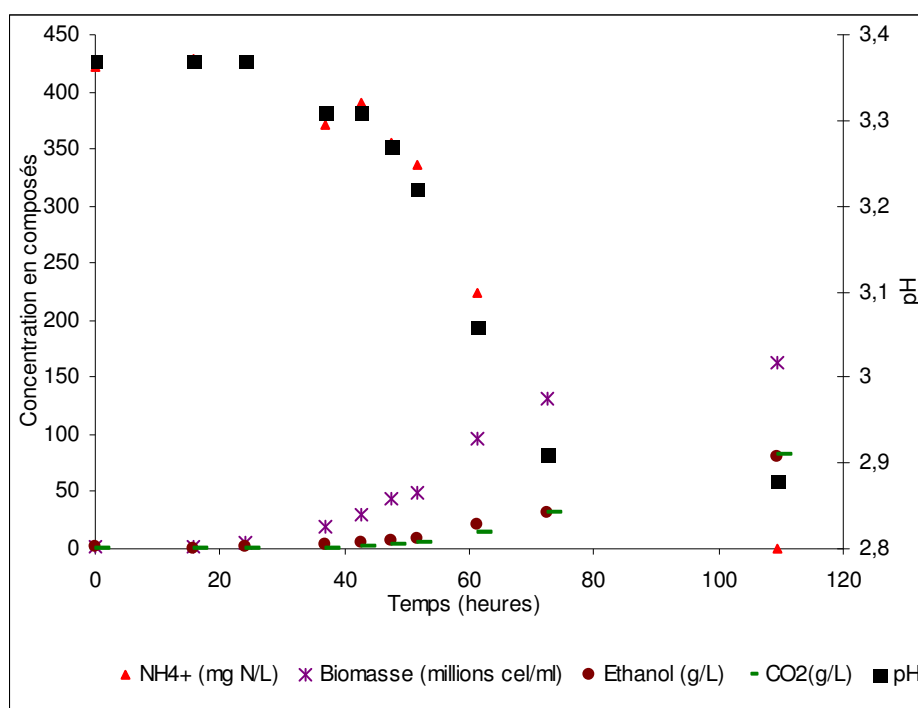


Figure.V.1. Evolution de l'éthanol, de la biomasse, du dioxyde de carbone, du pH et de l'ammonium au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_NH₄.

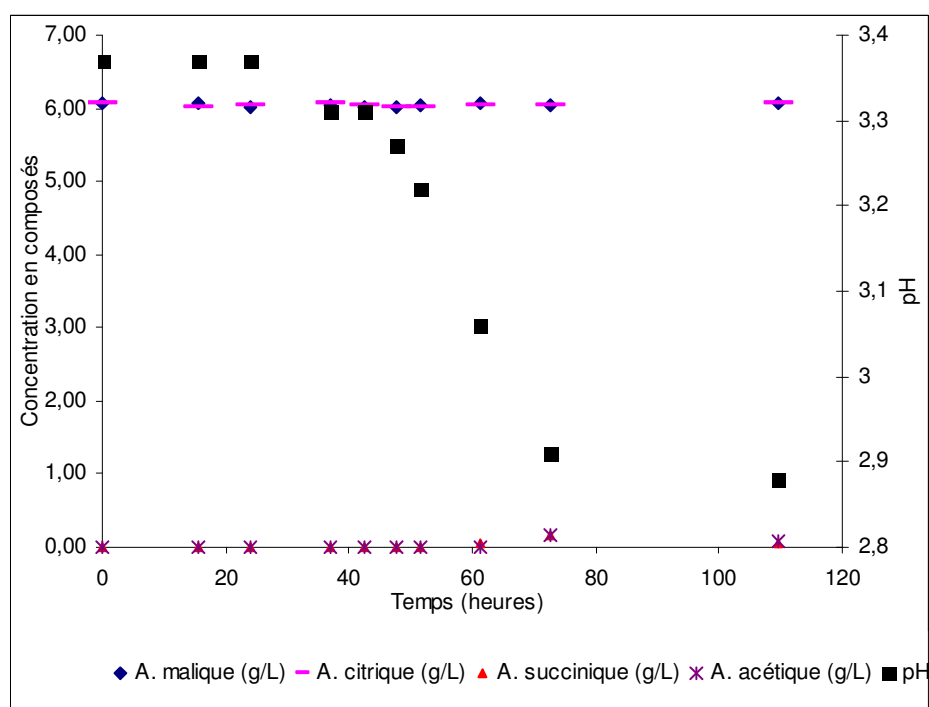


Figure.V.2. Evolution de l'acide malique, de l'acide citrique, de l'acide succinique, de l'acide acétique et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_NH₄.

La fermentation sur milieu MS_NH4 peut être découpée en deux grandes périodes. Au cours de la première période, de 0 à 40h, l'activité métabolique lente se traduit par une faible consommation de substrats et de production de métabolites et de biomasse. La production d'éthanol et de CO₂ est faible (respectivement 4 et 3,5 g.L⁻¹) et la consommation d'azote ammoniacal se limite à environ 30 mg N.L⁻¹ (figure V.1). Aucun acide organique n'est produit ou consommé.

Durant la seconde phase, de 40 à 109 heures (arrêt volontaire de la fermentation), on note une activité métabolique plus importante. La concentration en biomasse augmente fortement pour atteindre 160 millions de cellules/mL en fin de phase exponentielle. La production d'alcool et de CO₂ passe respectivement de 4 à 82 g.L⁻¹ et de 3,5 à 81 g.L⁻¹. Les 420 mg N.L⁻¹ d'ions ammonium ont été consommés en totalité. Les concentrations en acides organiques restent très faibles (figure V.2). Au moment de l'arrêt de la fermentation, les acides lactique, succinique et acétique, absents initialement se retrouvent respectivement à des concentrations de 0, 0.16 et 0.18 g.L⁻¹. Les acides citrique et malique présents initialement chacun à hauteur de 6 g.L⁻¹ n'ont été ni consommés, ni produits.

L'ensemble de ces évolutions du milieu se traduit par une chute continue du pH. Le pH chute de 0,06 point (de 3,37 à 3,31) lors de la première phase et de 0,41 point lors de la seconde phase, soit au total une baisse de 0,47 point en fin de phase exponentielle de croissance de la biomasse.

V.1.2. Comparaison pH expérimental et simulé

Le calcul du pH par notre modèle nécessite la connaissance des composés du milieu de fermentation. Dans le cas d'un milieu synthétique comme celui utilisé dans notre fermentation, tous les composés présents sont connus. En entrant toutes les concentrations de ce milieu (cf. matériels et méthodes), notre modèle est donc théoriquement capable de calculer le pH du milieu synthétique initial, tous les équilibres de dissociation des composés étant renseignés. Notons également que lors de la préparation du milieu synthétique, le pH est ajusté à 3,37 avec de la soude. La quantité de soude utilisée pour cet ajustement est également entrée dans le modèle. La simulation du pH initial du milieu par le modèle donne exactement le même résultat que celui obtenu expérimentalement, à savoir un pH de 3,37. Ceci vient compléter la validation de notre modèle présentée au chapitre précédent. Quand nous

connaissions tous les composés avec leur concentration et leurs équilibres de dissociation, le modèle est capable de calculer précisément la valeur du pH de la solution.

Pour la suite de la fermentation, l'utilisation du modèle se fait en considérant certains composés comme constants et d'autres comme variables. Les constituants variables sont : l'ammonium, l'éthanol, les sucres et les acides organiques (bien que nous ayons observé que ceux-ci varient peu en cours de fermentation, leurs concentrations exactes mesurées au cours du temps sont entrées à chaque pas de calcul). Toutes les autres concentrations des constituants sont considérées constantes durant la fermentation. Les résultats de la simulation de l'évolution du pH par le modèle sont comparés aux données expérimentales sur la figure V.3. On obtient une très bonne adéquation entre le modèle et l'expérience. La plus grande erreur relative est de 1,6% ce qui correspond à l'erreur de mesure (0,05 sur 3,3 correspond à une erreur de 1,5% environ).

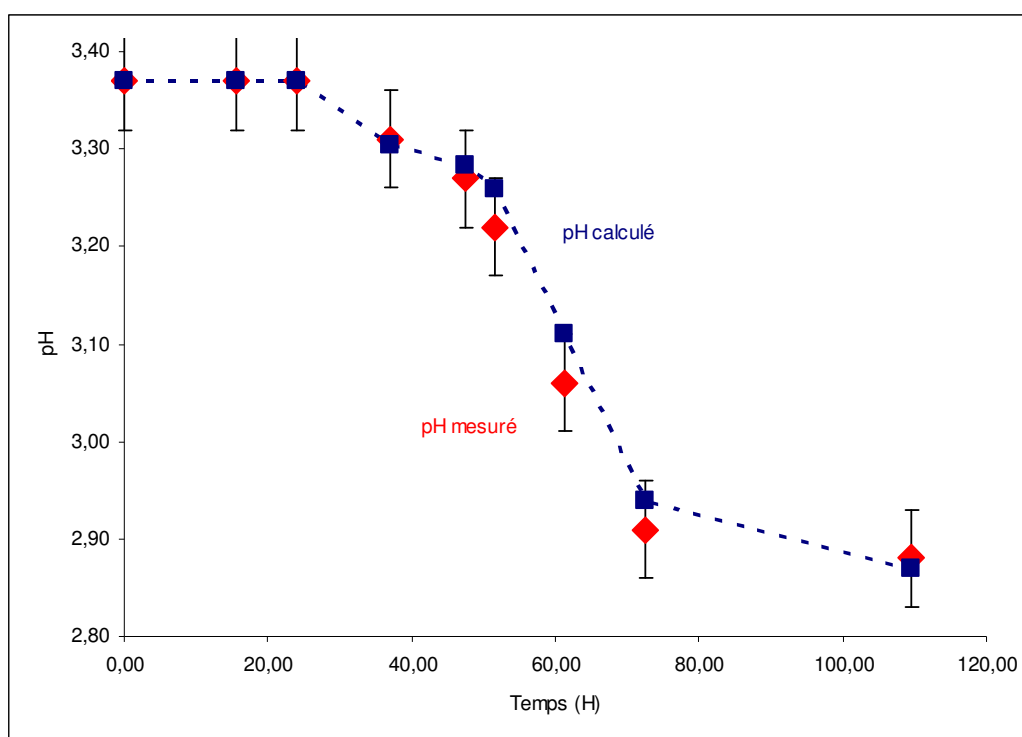


Figure. V.3. Comparaison des évolutions de pH expérimental et simulé.
Fermentation sur milieu MS_NH4.

Comme l'ont montré Castrillo J.I et coll. (1995) et Won J.I et coll. (1993), la consommation d'une mole de NH_4^+ par la levure entraîne le rejet d'une mole de H^+ dans le milieu extra cellulaire. Dans la formulation de notre modèle, ce phénomène est pris en compte dans le

calcul de l'électroneutralité. Au pH du moût, tout l'ammonium est sous forme cationique (NH_4^+). Lorsque sa concentration diminue en cours de fermentation, le modèle compense le déséquilibre des charges ioniques provoqué par cette disparition, par une concentration calculée en protons supérieure afin de respecter l'électroneutralité. Ainsi, pour un ion ammonium disparu, le modèle calcule l'apparition d'un ion H^+ .

De cette simulation, nous pouvons conclure que la formulation du modèle permet de calculer précisément le pH d'un moût dès lors que sa composition exhaustive est connue. Par la suite, en cours de fermentation, l'hypothèse de considérer que la plupart des éléments minéraux restent constants est validée. Enfin, le modèle permet également de représenter l'éjection de protons lors de l'assimilation de l'ion ammonium par la levure au cours de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* décrite dans la bibliographie.

Nous venons de voir que la fermentation du milieu MS_NH4 dont la source azotée est exclusivement de l'ammonium (420 mg N.L^{-1}) provoque une chute considérable du pH avec un delta 0,47 unité. Qu'en est-il de la fermentation du milieu MS_AA dont la source azotée est exclusivement des acides aminés ?

V.2. Fermentation sur moût synthétique avec des acides aminés comme seule source azotée

V.2.1. Résultats de la fermentation et discussions

Le milieu MS_AA diffère du milieu MS_NH4 par la source azotée utilisée. L'apport de carbone des acides aminés n'est pas jugé significativement important vis-à-vis du carbone des sucres. Tous les autres constituants des deux milieux sont identiques. Le milieu MS_AA contient 305 mg N.L^{-1} en azote assimilable (somme des atomes d'azote alpha-aminé) apporté par les acides aminés (valeur dosée).

La fermentation a été volontairement arrêtée comme dans le cas précédant au bout de 109h. Les évolutions des substrats et produits sont présentées sur les figures V.4 et V.5.

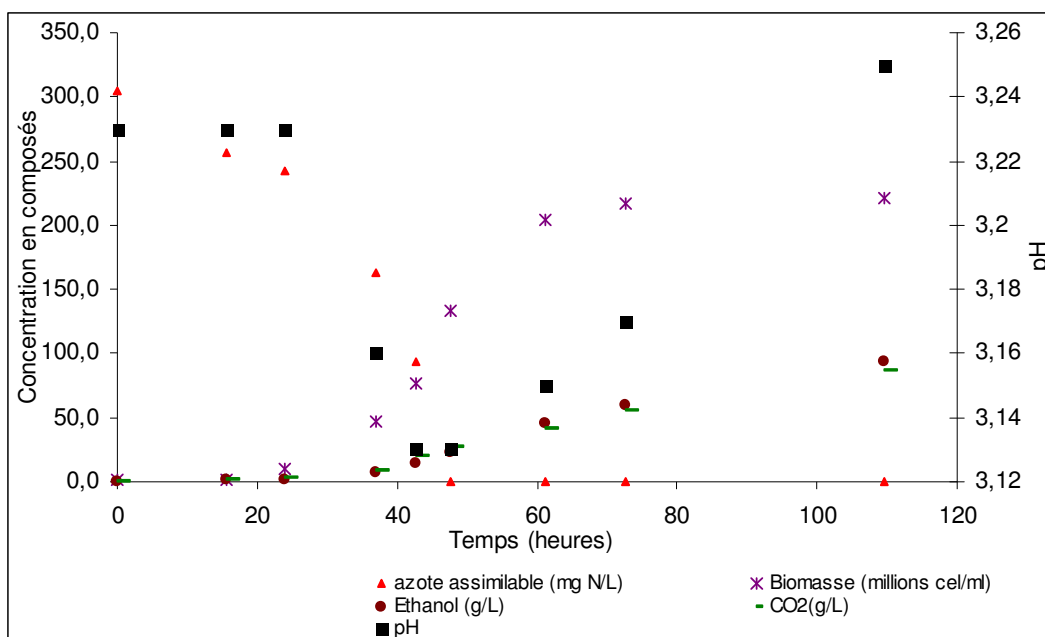


Figure.V.4. Evolution de l'éthanol, de la biomasse, du dioxyde de carbone, du pH et de l'azote assimilable au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_AA.

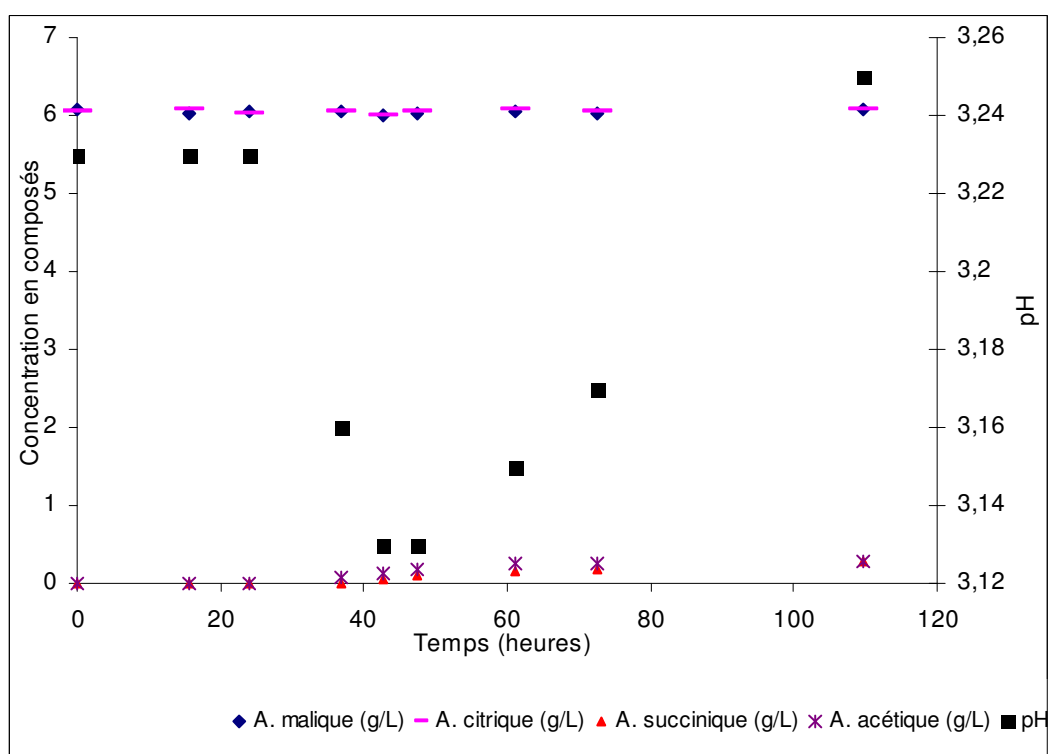


Figure.V.5. Evolution de l'acide malique, de l'acide citrique, de l'acide succinique, de l'acide acétique et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_AA.

Tout comme la fermentation sur milieu MS_NH₄, deux phases peuvent être distinguées. Durant la première période que l'on situe entre 0 et 20 heures, l'activité métabolique est faible. La biomasse reste à une concentration proche de l'inoculation et seulement 2 g.L⁻¹ de CO₂ et 2 g.L⁻¹ d'éthanol sont produits. La production et la consommation d'acides organiques est nulle. Les acides aminés sont toutefois légèrement consommés, leur concentration globale passant de 305 à 240 mg N.L⁻¹.

Pendant la seconde phase qui se situe entre 20 et 109 heures, l'activité métabolique s'accélère. La biomasse produite est de l'ordre de 200 millions de cellules par millilitre. Les quantités d'éthanol et de CO₂ produites sont respectivement 94 et 88 g.L⁻¹. Comme pour le milieu MS_NH₄, l'acide malique et citrique ne sont ni consommés, ni produits et une faible quantité d'acides organiques est produite : 0,3 g.L⁻¹ d'acide succinique et 0,3 g.L⁻¹ d'acide acétique. Durant cette phase, l'assimilation de l'azote alpha-aminé est totale. Dès la 50^{ème} heure de la fermentation, la concentration en azote assimilable est nulle.

En ce qui concerne l'évolution du pH, il est constant à sa valeur initiale de 3,23 lors de la première phase. Dans la seconde phase, il commence par chuter de 3,23 à 3,13 de la 20^{ème} à la 50^{ème} heure puis remonte régulièrement jusqu'à l'arrêt de la manipulation où il est à une valeur de 3,25. Nous constatons donc que la chute du pH est concomitante à la consommation de l'azote alpha-aminé et la remontée concomitante à la production d'éthanol.

Afin d'examiner la consommation de chaque acides aminé, un dosage au Biochrom 30 a été réalisé. Les résultats sont présentés sur les figures V.6.a, V.6.b, V.6.c et V.6.d. Afin de comparer leur vitesse de consommation, nous avons représenté sur ces graphes le taux d'avancement de leur assimilation en fonction du temps.

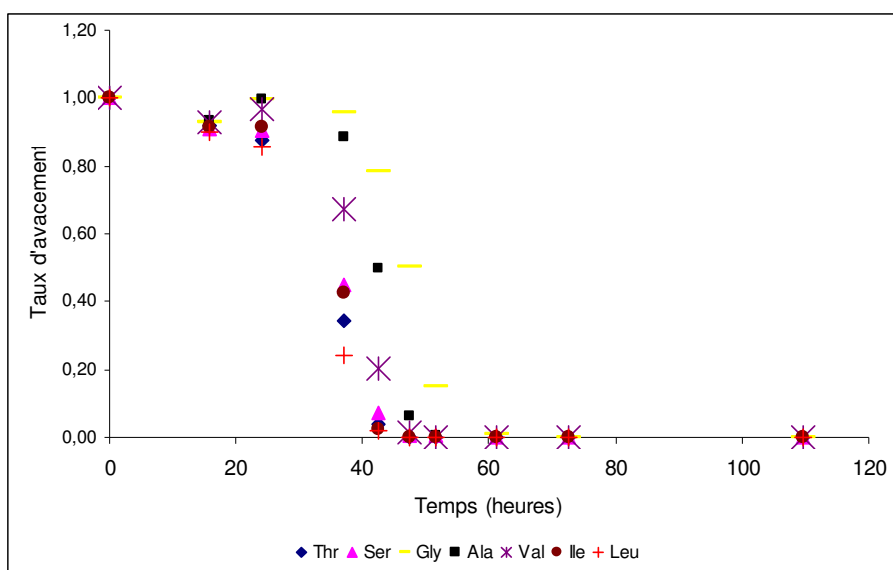


Figure.V.6.a. Taux d'avancement de la consommation des acides aminés mono acide et mono amine

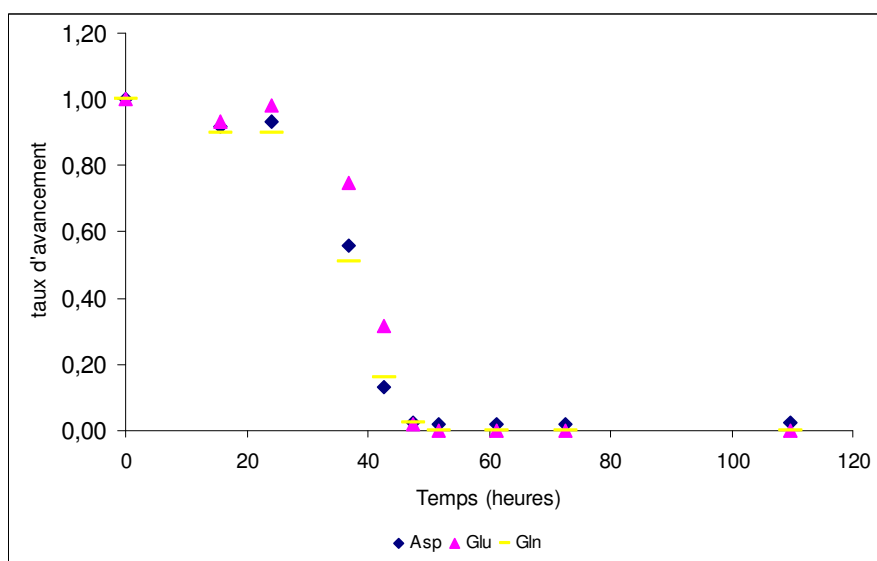


Figure.V.6.b. Taux d'avancement de la consommation des acides aminés di acides et leur amide

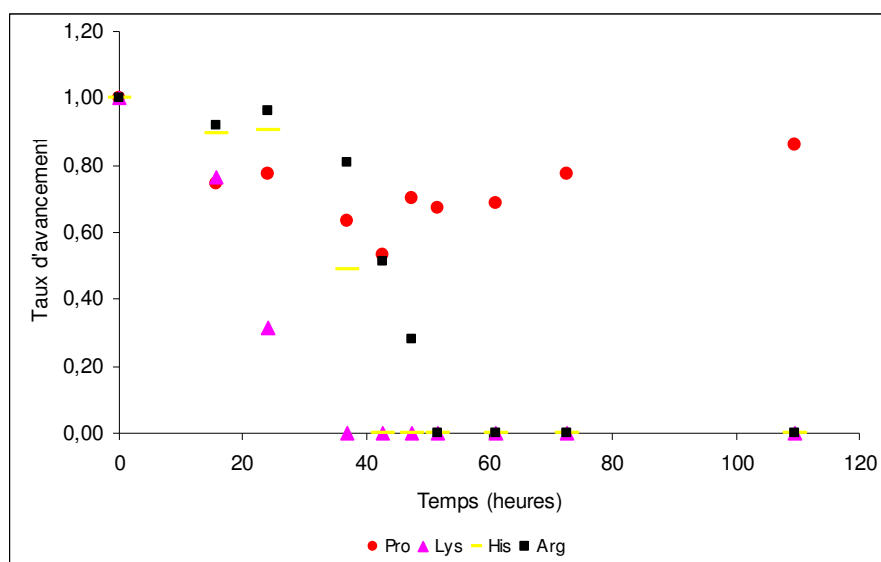


Figure.V.6.c. Taux d'avancement de la consommation des acides aminés di aminés et de la proline

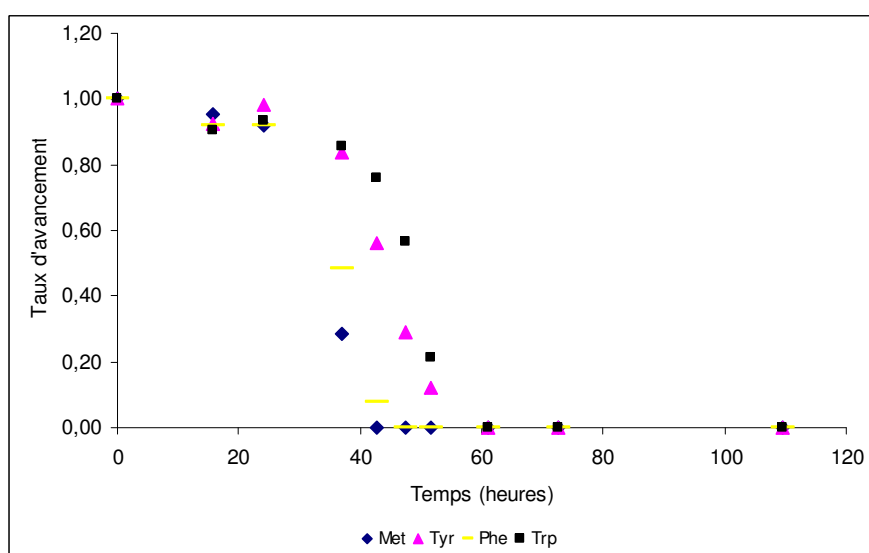


Figure.V.6.d. Taux d'avancement de la consommation des acides aminés aromatiques et soufrés

D'après ces observations, on peut dire que tous les acides aminés excepté la proline sont totalement consommés au bout de 50 heures de fermentation. Globalement, leur vitesse d'assimilation est très semblable. Seule la lysine semble plus vite assimilée que les autres. Pour tous les autres, il est difficile de dégager des différences de cinétiques significatives. Ces résultats sont en désaccord avec la littérature (V. Jiranek et coll., 1995 ; G. Beltran et coll., 2004) qui ont montré que les acides aminés ont des vitesses de consommation différentes. Le cas de la proline est particulier. Cet acide aminé n'est assimilé qu'à environ 20% de sa quantité initiale. D'après la littérature, la proline ne peut être assimilée par la levure de par sa

structure. Par contre, il est capable de pénétrer dans la cellule et d'être stocké. Cette hypothèse pourrait expliquer la petite disparition observée. En conséquence, pour notre modèle, nous considérerons que la proline n'est pas du tout assimilée.

Le dosage des acides aminés individuels nous a également permis de déterminer la provenance des 305 mg N.L⁻¹ d'azote assimilable du milieu. Le tableau V.1 récapitule la quantité d'azote assimilable apportée par chacun de ces acides aminés.

Tableau V.1. Quantité d'azote assimilable apportée par chacun des acides aminés dans le milieu MS_AA.

Acides aminés	Pourcentage (%)	Quantité azote alpha aminé (mg N/L)
Acide aspartique	3,0	9,1
Acide glutamique	7,8	23,8
Alanine	15,5	47,1
Arginine	19,6	59,6
Cystéine	0,0	0,0
Glutamine	12,8	39,2
Glycine	2,5	7,5
Histidine	2,1	6,3
Isoleucine	2,4	7,4
Leucine	3,5	10,7
Lysine	0,9	2,8
Méthionine	1,6	4,9
Phénylalanine	2,2	6,8
Proline	0,0	0,0
Sérine	6,9	21,1
Thréonine	5,9	18,1
Tryptophane	8,5	25,9
Tyrosine	1,1	3,3
Valine	3,7	11,3
Total	100,0	305,0

L'azote assimilable est majoritairement apporté par l'alanine, l'arginine et la glutamine (presque 50% à eux trois). En deuxième plan, nous avons la sérine, le tryptophane, la thréonine et l'acide glutamique dont les concentrations sont comprises entre 18 et 26 mg N.L⁻¹ (7 à 8% chacun). Pour le reste des acides aminés, on note des concentrations comprises entre 5 et 10 mg N.L⁻¹ d'azote assimilable.

V.2.2. Hypothèses sur l'impact de l'assimilation des acides aminés sur l'évolution du pH.

Il a été souligné dans la partie bibliographique la complexité des phénomènes d'assimilation et d'incorporation des acides aminés par la cellule levurienne. On ne connaît pas avec exactitude le type d'échange qui se déroule lorsqu'un acide aminé entre dans la cellule. Les mécanismes de transports, la nature des transporteurs sont mal identifiés pour chaque acide aminé et de plus ils semblent varier selon les milieux. Afin d'évaluer l'effet sur le pH de l'assimilation des acides aminés, la démarche choisie a été de proposer des hypothèses à priori sur les mécanismes d'incorporation et de les tester avec notre modèle. Celui-ci semblant robuste pour des milieux synthétiques comme l'ont montré les tests précédents, nous considérerons qu'une hypothèse qui donne des résultats de simulation éloignés des données expérimentales doit être écartée. En revanche, une hypothèse permettant de simuler correctement les résultats expérimentaux ne peut être admise comme vraie mais doit être confrontée à d'autres données expérimentales.

La première hypothèse envisagée est : un acide aminé assimilé par la levure n'a pas d'impact sur le pH. Cette hypothèse peut être très rapidement écartée dans la mesure où une chute de pH de 0,1 point est observée dans les 50 premières heures de fermentation. Comme par ailleurs aucun autre composé pouvant avoir un impact sur le pH n'est consommé ou produit, les simulations avec cette hypothèse ne permettent pas de représenter les valeurs expérimentales. En effet, le pH reste constant alors que la mesure chute (graphe non montré).

La seconde hypothèse envisagée est que comme pour l'assimilation de l'ammonium, chaque azote alpha-aminé assimilé entraîne l'éjection d'un proton dans le milieu extracellulaire. La figure V.7 présente les résultats obtenus avec la simulation de cette hypothèse. Le pH minimum calculé de 3,03 est plus faible que le pH minimum mesuré à 3,13. Donc la baisse totale simulée est de 0,2 point alors qu'expérimentalement elle n'est que de 0,1 point. La simulation de la fin de fermentation semble correcte puisque l'écart de 0,1 point de pH est maintenu quasi constant lors de la remontée du pH. Nous pouvons donc penser que l'influence de l'éthanol est bien représentée alors que par contre l'influence de l'assimilation des acides aminés est surestimée. Nous en concluons donc que cette hypothèse d'assimilation des acides aminés peut être écartée.

De ces deux hypothèses testées il résulte que le nombre moyen de protons excrétés par l'assimilation des acides aminés se situe entre 0 et 1 ou que plus vraisemblablement seuls

certains acides aminés rejettent un proton lors de leur consommation par la levure. La question est de savoir lesquels ?

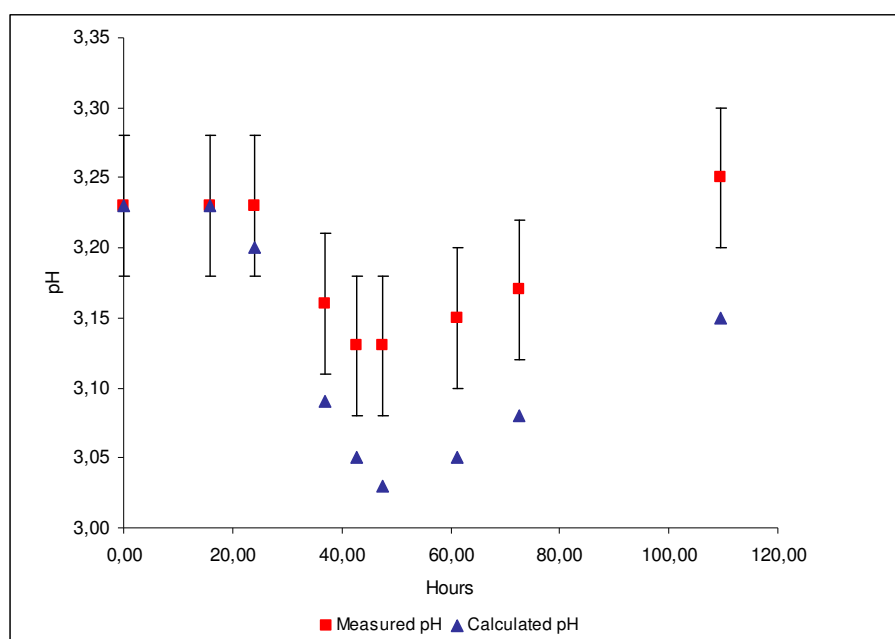


Figure. V.7. Comparaison des évolutions de pH expérimental et simulé. Fermentation sur milieu MS_AA : cas de l'hypothèse 2.

La troisième hypothèse alors envisagée est que l'assimilation des acides aminés par la levure respecte le bilan d'électroneutralité. Les acides aminés globalement chargés positivement entraîneront l'excrétion de protons en nombre équivalent à leur charge positive, les acides aminés neutres n'entraîneront aucun effet sur le pH et les acides aminés globalement chargés négativement entraîneront une disparition de protons équivalente à leur charge négative. Pour simuler cette hypothèse, la dissociation de chacun des acides aminés au pH du moût doit être calculée. Les équations de dissociation des acides aminés présentés au chapitre IV permettent d'obtenir les proportions d'acides aminés du milieu MS_AA en fonction de leur charge (tableau V.2).

Tableau V.2. Proportions des acides aminés suivant leur charge dans le milieu MS_AA initial au pH de 3,23.

Acides aminés	%A+	%A+-	%A-	%A2-	%A2+
Ac aspartique	5,54	76,52	17,94	0,00	0,00
Thréonine	20,08	79,92	0,00	0,00	0,00
Sérine	8,36	91,64	0,00	0,00	0,00
Acide glutamique	7,69	84,27	8,05	0,00	0,00
Glutamine	8,01	91,99	0,00	0,00	0,00
Proline	4,99	95,01	0,00	0,00	0,00
Cystéine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Glycine	11,65	88,35	0,00	0,00	0,00
Alanine	11,41	88,59	0,00	0,00	0,00
Valine	12,63	87,37	0,00	0,00	0,00
Cystine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Méthionine	7,36	92,64	0,00	0,00	0,00
Isoleucine	10,95	89,05	0,00	0,00	0,00
Leucine	11,18	88,82	0,00	0,00	0,00
Tyrosine	8,54	91,46	0,00	0,00	0,00
Phénylalanine	8,54	91,46	0,00	0,00	0,00
Lysine	91,82	0,00	0,00	0,00	8,18
Histidine	3,74	96,10	0,16	0,00	0,00
Tryptophane	14,52	85,48	0,00	0,00	0,00
Arginine	91,99	0,00	0,00	0,00	8,01

Ce tableau montre qu'au pH du moût il existe aussi bien des acides aminés sous forme cationiques, neutres ou anioniques. L'arginine et la lysine sont les acides aminés les plus chargés positivement. C'est donc leur concentration qui va le plus influencer l'évolution du pH. S'ils sont présents en grande quantité, la chute du pH sera plus prononcée. La plupart des autres acides aminés n'ont que 10% environ de leur concentration sous forme cationique, la grande majorité étant neutre. Seuls l'acide aspartique et glutamique ont une proportion non négligeable (18% et 8%) sous forme anionique.

La connaissance des cinétiques de consommation individuelle des acides aminés permet d'avoir l'évolution des quantités des acides aminés au cours du temps. Nous pouvons ainsi simuler avec le modèle l'hypothèse proposée. Les valeurs globales des concentrations en acides aminés chargés sont présentées dans le tableau V.3

Tableau V.3. Concentrations en acides aminés en fonction de leur charge au cours du temps.

Temps (heures)	azote alpha aminé totale (mg N/L)	acides aminés de charge positive (mg N/L) A+	acides aminés de charge positive (mg N/L) A2+	acides aminés de charge neutre (mg N/L) A±	acides aminés de charge négative (mg N/L) A-	acides aminés de charge négative (mg N/L) A2-
0	305,0	83,2	5,0	213,2	3,6	0,0
15,7	256,0	69,7	4,2	179,1	3,0	0,0
24	243,0	66,1	4,0	170,0	2,9	0,0
36,937	163,0	49,1	3,1	108,9	1,9	0,0
42,63	93,0	33,1	2,2	56,9	0,7	0,0
47,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
61,16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72,55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
109,54	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Dans notre milieu, avec la répartition des acides aminés que nous avons, nous remarquons donc que les acides aminés sont à 70 % sous forme globalement neutre, 27% ont globalement 1 charge positive, 1,7% ont globalement 2 charges positives alors que seulement 1,3% ont globalement 1 charge négative et aucun n'ont de charge doublement négative.

V.2.3. Simulation de la cinétique du pH expérimental

Comme dans le cas du milieu MS_NH₄, le milieu MS_AA initial est parfaitement maîtrisé. Toutes les concentrations des composés présents sont connues et la quantité de soude versée pour ajuster le pH à une valeur initiale de 3,23 a été notée. Avec ces entrées, le calcul du pH initial du modèle donne une valeur de 3,23. L'adéquation est donc parfaite entre pH du moût initial mesuré et calculé. Pour la suite de la fermentation, la plupart des concentrations sont considérées constantes hormis les concentrations en sucre, éthanol, acides aminés et acides organiques.

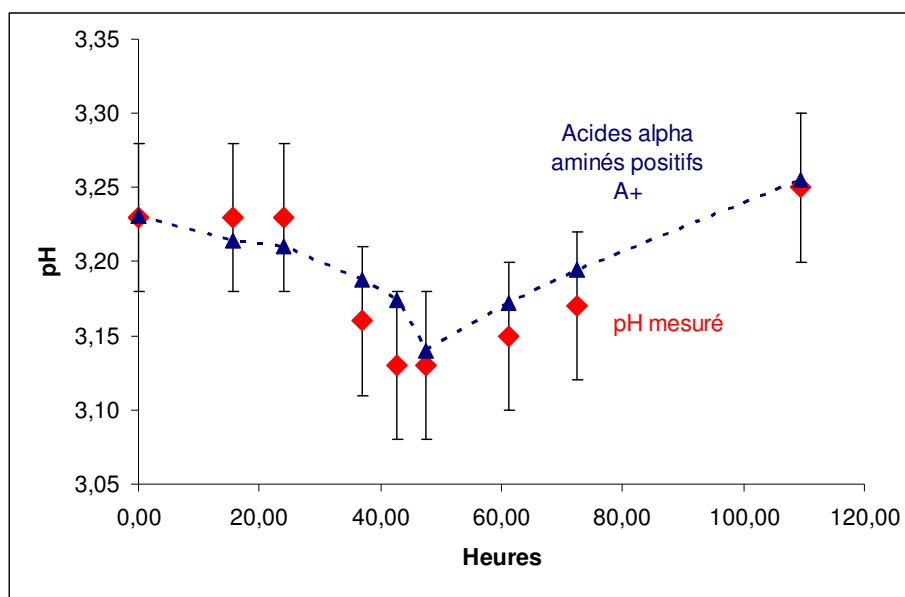


Figure. V.8. Comparaison des évolutions de pH expérimental et simulé. Fermentation sur milieu MS_AA : cas de l'hypothèse 3

La comparaison entre les valeurs simulées avec l'hypothèse 3 d'assimilation des acides aminés et les valeurs expérimentale est présentée sur la figure V.8. Nous observons une bonne adéquation du pH expérimental et calculé. L'écart maximal observé est de 0,04 point de pH ce qui est inférieur à l'erreur de mesure de la valeur expérimentale.

Cette simulation ne permet donc pas d'infirmer l'hypothèse faite sur l'assimilation des acides aminés par la levure. Ce serait donc la charge globale des acides aminés au pH du moût qui déterminerait l'effet sur le pH. Cette hypothèse est cependant à valider par d'autres expérimentations.

V.3. Fermentation sur moût synthétique contenant du NH_4^+ et des acides aminés : milieu MS300

Cette troisième fermentation a été réalisée dans un milieu contenant les deux sources azotées testées jusqu'à présent individuellement. Ce milieu est dénommé MS_300. Il a une composition de 204 mg N.L^{-1} en azote alpha aminés provenant des acides aminés et de 120 mg N.L^{-1} d'ions ammonium ce qui correspond à un total de 324 mg N.L^{-1} azote assimilable.

L'objectif est de tester si la mise en présence de ces deux sources modifie les effets sur le pH qui ont été observés précédemment lorsqu'elles ont été utilisées séparément.

V.3.1. Résultats de la fermentation et discussions

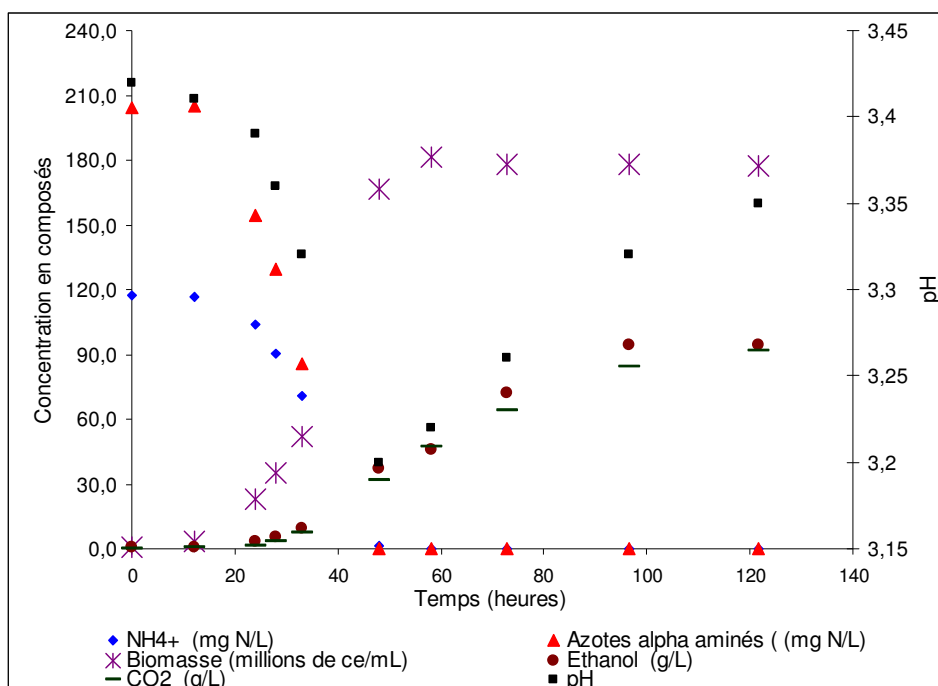


Figure.V.9. Evolution de l'éthanol, de la biomasse, du dioxyde de carbone, de l'ammonium, de l'azote alpha aminé et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_300.

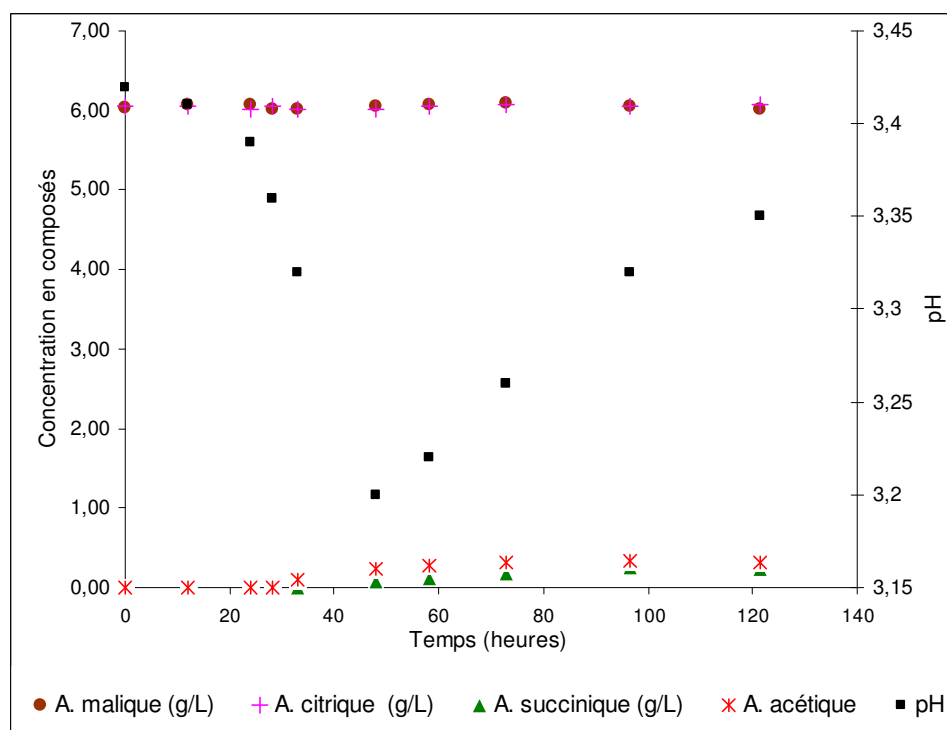


Figure.V.10. Evolution de l'acide malique, de l'acide citrique, de l'acide lactique, de l'acide succinique, de l'acide acétique et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MS_300.

Les deux phases observées précédemment se retrouvent également lors de cette fermentation. De 0 à 20 heures, l'activité métabolique est faible, avec peu de production d'éthanol et de CO₂, aucune production ou consommation d'acides organiques et une consommation en matière azotée assez faible (au total 60 mg N.L⁻¹ d'azote assimilable). Durant la seconde phase, entre 20 et 120 heures de fermentation, la biomasse se développe pour atteindre 180 millions de cellules par millilitre, avec une production de 91 g.L⁻¹ de CO₂ et 94 g.L⁻¹ d'éthanol. La totalité de l'azote alpha-aminé et ammoniacal est consommé au bout de 50 heures avec aucune différence de cinétique significative entre les deux sources. Comme pour les deux autres milieux, les concentrations en acides organiques varient peu ; seuls l'acide succinique et acétique sont produits à des concentrations autour de 0,3 g.L⁻¹.

L'évolution du pH au cours de la fermentation est comparable à celle observée pour les deux autres milieux : une chute concomitante à la consommation de la source azotée puis une remontée continue lors de la production d'éthanol. Ainsi, le pH chute de 3,42 à 3,20 durant les 50 premières heures puis remonte à 3,35 durant les 70 heures suivantes.

Le dosage individuel des acides aminés en cours de fermentation a également été réalisé. Les proportions sont les mêmes que pour le milieu MS_AA dans la mesure où la même solution mère d'acides aminés est utilisée. Aucune différence significative avec les graphes V.6.a à V.6.d. n'a été notée en ce qui concerne les cinétiques d'assimilation de chacun.

V.3.2. Analyse comparative des cinétiques sur les trois milieux synthétiques de fermentation

Ces trois expériences sur moût synthétique peuvent être utilisées pour comparer l'effet des sources azotées sur les cinétiques de fermentation. En terme de quantités produites, il est difficile de comparer les résultats finaux dans la mesure où les fermentations ont été arrêtées avant leur fin. Cependant, il ne semble pas y avoir de différences notables que ce soit sur l'alcool ou la consommation et production des acides organiques. Par contre, sur les quantités de biomasse, les moûts avec ammonium ne permettent pas d'atteindre le niveau du moût avec acides aminés : 160 millions pour MS_NH₄ contre 180 et 200 millions pour MS300 et MS_AA.

En terme de cinétique, la fermentation avec le milieu MS_NH₄ est plus lente que celle avec les milieux MS300 et MS_AA. Quand le milieu ne contient aucun acide aminé, le métabolisme des levures apparaît plus lent à se mettre en place. Ainsi, le démarrage de la

phase exponentielle de croissance de la biomasse ne se fait qu'à partir de 40 heures contre 20 heures pour les milieux avec acides aminés. Ces différences pourraient provenir du fait que la levure doit fabriquer des acides aminés à partir de l'ammonium contrairement aux milieux MS_AA et MS300 où les acides aminés sont directement incorporés dans la cellule. Suivant la source d'azote, la levure met en place un système métabolique particulier. C'est ce qu'on décrit Cooper (1982) et Magasanik (1992).

En terme de chute de pH, évidemment, plus le milieu contient d'ions ammonium et plus cette chute est prononcée puisque l'incorporation de chaque NH_4^+ entraîne l'éjection d'un proton. Concernant les acides aminés, d'après le modèle, le rapport azote alpha-aminé consommé sur protons rejetés dans le milieu extérieur sera compris entre 0 à 1. Ce rapport, et donc la chute de pH, dépend d'après notre hypothèse, de la proportion de chaque acide aminé et du pH du moût. Pour notre composition en acides aminés, le rapport est d'environ 0,25. Ces observations vont dans le même sens que des études menées récemment par M.J. Torija et coll. (2003) qui ont noté une différence de chute de pH en fonction du type de source azotée.

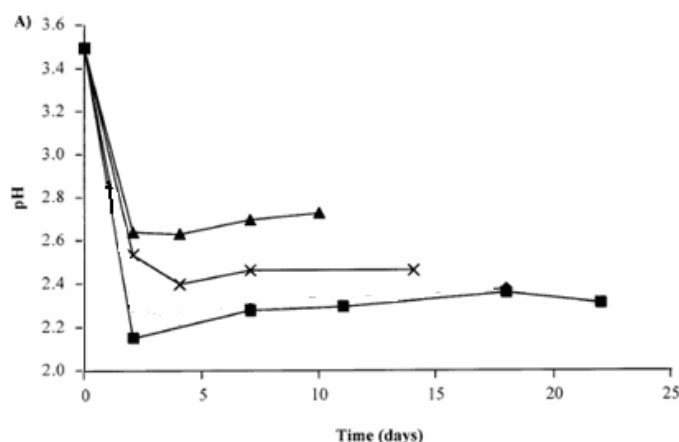


Figure V.11. Evolution du pH au cours d'une fermentation alcoolique sur différentes sources azotées. (▲) acides aminés ; (■) ions ammonium ; (X) acides aminés + ions ammonium. D'après M.J. Torija et coll. (2003)

V.3.3. Evaluation de la proportion des acides aminés en fonction de leur charge.

Comme pour le milieu précédent, les proportions de chacune des formes cationiques, neutres et anioniques des acides aminés sont calculés. Les constantes de dissociation de chacun des acides aminés étant connues, sont calculés les pourcentages de présence de chacune des espèces de dissociation. Le pH initial étant ici de 3,42 contre 3,23 précédemment, les proportions de chacune des formes ne sont pas rigoureusement identiques. Cependant, la solution mère d'acides aminés étant la même, les variations entre les deux milieux sont minimales. Au temps initial, nous en retrouvons 73 % sous forme globalement neutre, 24% avec globalement 1 charge positive, 1,3% avec 2 charges positives alors que seulement 1,7% ont globalement 1 charge négative et aucun n'ont de charge doublement négative (tableau V.4).

Tableau V.4. Proportions d'acides aminés en fonctions de leur charge et du temps dans le milieu MS300 ; pH initial égal à 3,42.

Temps (heures)	azote alpha aminé totale (mg N/L)	acides aminés de charge positive (mg N/L) A ⁺	acides aminés de charge positive (mg N/L) A ²⁺	acides aminés de charge neutre (mg N/L) A [±]	acides aminés de charge négative (mg N/L) A ⁻	acides aminés de charge négative (mg N/L) A ²⁻
0	204,0	50,2	2,7	148,3	3,3	0,0
12,12	204,9	50,4	2,6	149,0	3,3	0,0
24	154,1	39,5	1,8	110,3	2,6	0,0
28,06	129,6	35,5	1,4	90,3	2,1	0,0
33,08	85,7	26,1	0,8	57,1	1,3	0,0
48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
58,07	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72,83	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
96,62	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
121,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Ce sont ces valeurs qui sont utilisées dans le modèle pour calculer le nombre de protons éjectés ou consommés lors de l'assimilation, l'électroneutralité devant toujours être respectée.

V.3.4. Simulation de la cinétique du pH expérimental

Comme pour les deux autres milieux précédents, notre modèle permet de retrouver par le calcul exactement la valeur du pH mesurée au point initial, tous les constituants étant connus. A chaque temps de calcul du pH, sont entrés dans le modèle les concentrations en

acides organiques, ions ammoniums, acides aminés, sucre et éthanol. Les autres composés sont maintenus constants à leur valeur initiale. Les résultats de la simulation du pH sont comparés aux valeurs expérimentales sur la figure V.12.

Nous obtenons une très bonne adéquation entre le pH expérimental et calculé. L'écart maximal enregistré est de 0,04 point de pH ce qui est inférieur à l'erreur de mesure. Bien que les quantités d'acides aminés initiales soient différentes du milieu MS_AA, les valeurs mesurées lors de cette expérience n'infirment donc pas non plus l'hypothèse faite quant à l'assimilation des acides aminés sur les levures. Cependant, comme les proportions initiales de chacun sont voisines, une expérience complémentaire sera nécessaire pour valider plus complètement l'hypothèse.

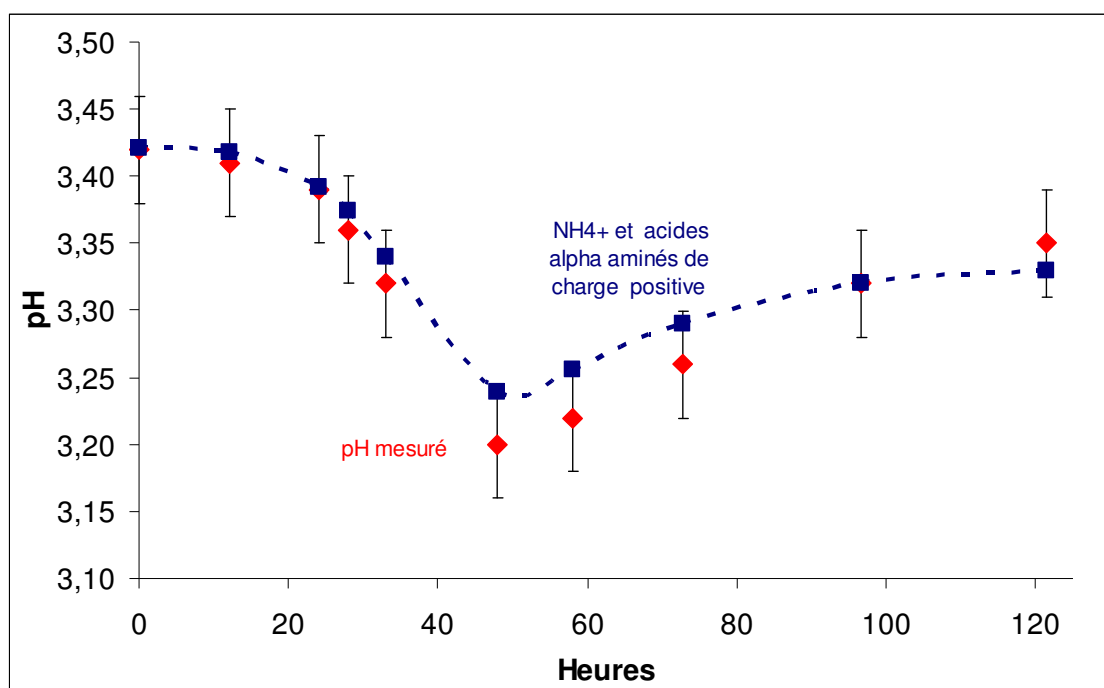


Figure. V.12. Comparaison des évolutions de pH expérimental et simulé.
Fermentation sur milieu MS300.

V.4. Cas de la fermentation alcoolique sur moût naturel

La fermentation du moût de raisins blancs dénommé MR dont la composition est présentée dans le chapitre matériel et méthodes a été réalisée au laboratoire de génie chimique de Toulouse. Les conditions de fermentation et le type de fermenteur sont décrits aussi dans ce chapitre. Les différents composés majoritaires ont été suivis et dosés au cours de la fermentation. Les résultats de ces dosages sont présentés dans la figure V.13 et V.14.

V.4.1. Résultats de la fermentation et discussions

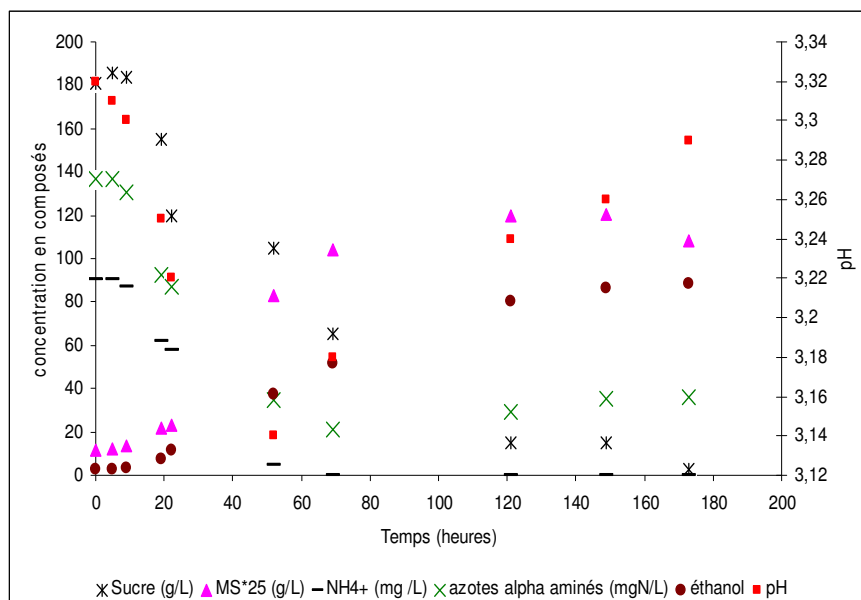


Figure.V.13. Evolution des sucres totaux, de l'éthanol, de la biomasse, du dioxyde de carbone, de l'ammonium, de l'azote alpha aminé et du pH au cours de la fermentation sur milieu MR.

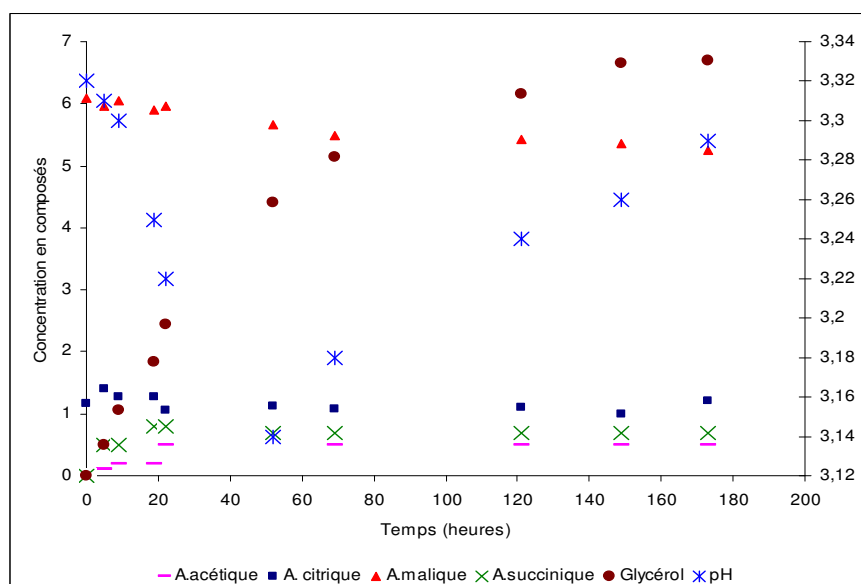


Figure.V.14. Evolution du glycérol, de l'acide malique, de l'acide citrique, de l'acide succinique, de l'acide acétique et du pH au cours de la fermentation alcoolique sur milieu MR.

Avec une concentration initiale en sucres totaux (glucose + fructose) d'environ 180 g/L, La biomasse obtenue est d'environ 5 g/L, ce qui correspond à 200 millions de cellules par millilitre. La concentration en éthanol obtenue en fin de fermentation (épuisement des sucres) avoisine les 88 g/L et celle en CO₂ 85 g/L. La production de glycérol qui accompagne celle de l'éthanol atteint en fin de fermentation environ 7 g/L.

La production d'acides organiques est beaucoup plus prononcée que dans les milieux synthétiques. On obtient respectivement 0,7 et 0,5 g/L d'acide succinique et d'acide acétique qui sont les plus importants en quantité. On ne note aucune production d'acide lactique.

Avec une concentration d'environ 1,5 g/L, l'acide citrique qui est un constituant du moût initial reste constant tout au long de la fermentation. Quant à l'acide malique qui est l'acide organique majoritaire (car le moût de raisins blancs ne contient pas d'acide tartrique), on note une légère consommation par la levure en fin de fermentation. Sa concentration passe de 6 g/L en début de fermentation à environ 5,4 g/L. Il est mentionné dans la littérature que certaines souches de levures consomment une petite partie de l'acide malique pour le convertir en alcool au cours de la fermentation alcoolique. Cela semble être le cas ici avec la souche QA23.

Les sources azotées sont respectivement l'ammoniac et les acides aminés. Le dosage enzymatique a révélé la présence d'environ 90 mg/L d'azote ammoniacal et 136 mg N/L d'azote alpha aminé ; ce qui donne une concentration en azote assimilable de 226 mg.L⁻¹. Comparé aux milieux précédents, le moût de raisins est moins concentré en azote assimilable. Comme dans le milieu MS300, les ions ammonium et les acides aminés sont consommés simultanément. Par contre, si leur consommation s'arrête au bout de 50 heures, ils ne sont pas totalement épuisés. 25% de la quantité initiale (environ 35 mg.L⁻¹) restent présents tout au long de la culture.

L'évolution du pH est conforme à celle observée lors des fermentations en milieu synthétique : une chute de 3,32 à 3,14 correspondant à la consommation des sources azotées puis une remontée jusqu'à 3,30 liée à la production d'éthanol.

V.4.2. Evaluation de la proportion des acides aminés en fonction de leur charge

Un dosage au Biochrom 30 d'acides aminés contenus dans le moût de raisins a été réalisé. En plus des mêmes acides aminés que ceux des milieux synthétiques précédents, on note la présence du bêta alanine, la gaba, l'ornithine, l'éthanolamine et de l'asparagine. Tous les acides aminés présents dans le moût initial sont consommés à l'exception de l'éthanolamine, du bêta alanine et de la proline. Aucune différence notable entre toutes les vitesses d'assimilation des acides aminés n'apparaît. Ceux qui sont consommés le sont en 50 heures de fermentation.

Les concentrations des différents acides aminés dans le mout initial sont présentés dans le tableau V.5 et comparées avec celles des moûts synthétiques MS_AA et MS_300.

TableauV.5. Comparaison de la concentration des acides aminés selon le milieu.

Acides aminés	Quantité azote alpha aminé (mg N/L) (MR)	Quantité azote alpha aminé (mg N/L) (MS_AA)	Quantité azote alpha aminé (mg N/L) (MS300)
Acide aspartique	7,54	9,1	6,11
Acide glutamique	8,17	23,8	15,95
Alanine	12,42	47,1	31,52
Arginine	40,45	59,6	39,89
Cystéine	0,00	0,0	0,00
Glutamine	0,00	39,2	26,20
Glycine	1,19	7,5	5,03
Histidine	1,64	6,3	4,24
Isoleucine	1,74	7,4	4,95
Leucine	2,82	10,7	7,17
Lysine	1,26	2,8	1,87
Méthionine	0,45	4,9	3,25
Phénylalanine	3,56	6,8	4,54
Proline	0,00	0,0	0,00
Sérine	4,79	21,1	14,12
Thréonine	3,53	18,1	12,08
Tryptophane	0,00	25,9	17,34
Tyrosine	1,69	3,3	2,17
Valine	3,68	11,3	7,58
B-alanine	3,80	305,0	204,0
Gaba	9,92		
Ethanolamine	3,88		
ornithine	1,05		
Asparagine	1,44		
Total	115,00		

Par comparaison au milieu synthétique, on peut constater la pauvreté du moût naturel en acides aminés. Dans cette étude, le moût de raisin (milieu MR) utilisé ne contient pas de glutamine et de tryptophane. Par contre, on note la présence d'autres acides aminés comme le bêta alanine, le Gaba, l'éthanolamine, l'ornithine et l'asparagine, non présents dans les moûts synthétiques. Notons également les proportions différentes d'acides aminés assimilables entre les moûts.

A partir de ces valeurs (Milieu MR), les proportions d'acides aminés en fonction de la charge sont déterminées. Les proportions de chacune des formes dissociées sont ensuite calculées de la même façon que précédemment (tableau V.6). Au pH initial, nous avons un pourcentage en acides aminés de charge positive qui est d'environ 36%, 60% pour les neutres et 2% pour les acides aminés de charge globalement négative.

Tableau V.6. Proportions d'acides aminés en fonctions de leur charge et du temps dans le milieu MR; pH initial égal à 3,32.

Temps (heures)	azote alpha aminé totale (mg N/L)	acides aminés de charge positive (mg N/L) A+	acides aminés de charge positive (mg N/L) A2+	acides aminés de charge neutre (mg N/L) A±	acides aminés de charge négative (mg N/L) A-	acides aminés de charge négative (mg N/L) A2-	NH4+ (mg N/L)
0,0	114,8	41,3	2,1	70,0	1,4	0,0	74,6
5,0	114,8	41,3	2,1	70,0	1,4	0,0	74,6
9,0	109,2	39,3	2,0	66,6	1,3	0,0	72,0
19,0	67,3	24,2	1,2	41,1	0,8	0,0	55,3
22,0	62,7	22,6	1,1	38,2	0,8	0,0	51,1
52,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7
69,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
121,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
149,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
173,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

V.4.3. Simulation de la cinétique du pH expérimental

Contrairement aux moûts synthétiques utilisés dans les expériences précédentes, la composition exhaustive du moût de raisins naturel n'est pas connue. Même si le dosage des composés majoritaires a été effectué, il est impossible de doser tous les constituants. Le calcul du pH initial avec les compositions connues donne une valeur de 3,5 contre une valeur mesurée de 3,32. Pour corriger ce biais initial, comme expliqué dans le chapitre précédent, une espèce fictive est introduite dans le modèle de façon à ramener le pH initial à la valeur

initiale mesurée. Ici, pour ce moût, il est nécessaire que cette espèce fictive corresponde à une espèce anionique de façon à abaisser le pH. Il pourrait s'agir d'anions non mesurés tels les sulfates ou les chlorures. La quantité équivalente nécessaire à l'ajustement du pH correspond à une molalité de $1,865 \cdot 10^{-2}$, ce qui n'est pas aberrant vis-à-vis des concentrations majoritaires mesurées. Cette quantité d'anions est par la suite supposée constante tout au long de la fermentation.

En partant des mêmes hypothèses que dans les cas précédents, la simulation du pH expérimental est alors réalisée. Le résultat de la simulation est présenté sur la figure V.15.

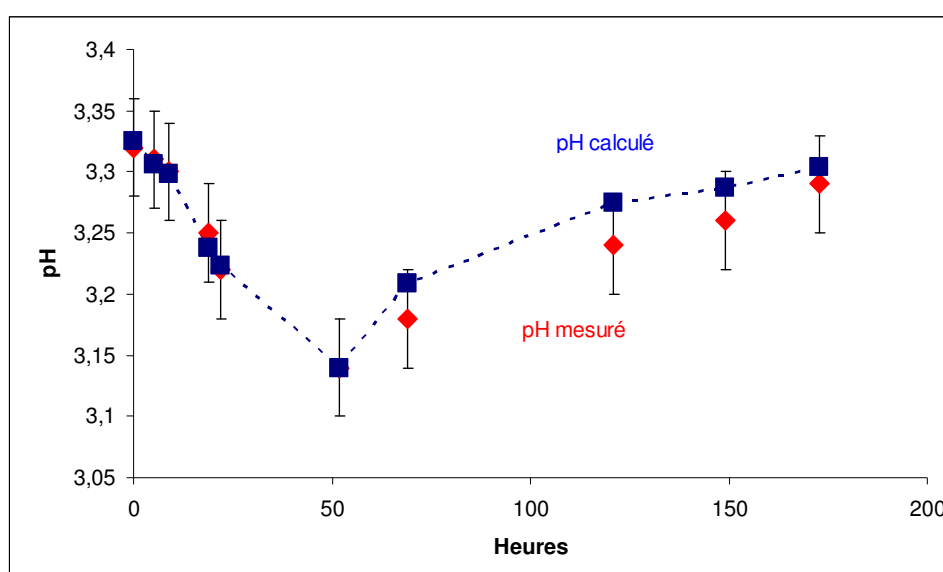


Fig. V.15. Comparaison des cinétiques du pH expérimental et simulé.
Fermentation sur milieu MR.

La simulation du pH de fermentation du moût de raisins blancs (milieu MR) donne de bons résultats. Les évolutions de pH calculées et expérimentales sont en bonne adéquation avec un écart maximal de 0,05 point de pH ce qui correspond à l'erreur de mesure. Cette expérience ne permet donc pas non plus d'infirmer l'hypothèse faite sur l'assimilation des acides aminés par la levure. Malgré des proportions d'acides aminés différentes des milieux synthétiques et donc des contributions en terme de charge positive et négative différentes de chacun des acides aminés, le modèle permet de représenter très correctement la chute du pH lors de la consommation des sources azotées. Ceci tend donc à valider notre hypothèse. L'augmentation du pH en fin de fermentation est également très bien représentée. La majeure partie est due à la production d'éthanol qui modifie les constantes de dissociations des constituants et en particulier les acides organiques. Notons également pour cet essai que la

consommation d'une partie de l'acide malique va également dans le sens de l'augmentation du pH en fin de fermentation. Le modèle représente bien ce phénomène.

VI. Conclusions et perspectives

Les objectifs que nous nous étions fixés au début de cette étude étaient de comprendre qualitativement et quantitativement l'évolution du pH au cours de la fermentation alcoolique de moût de raisins en vinification en blanc.

Au terme de ce travail, pour toutes les fermentations que nous avons menées, l'évolution du pH a été la même : une chute en début de fermentation concomitante avec la croissance de la biomasse et la consommation de l'azote, puis une remontée sur la fin de la fermentation avec la production de l'éthanol.

Nous avons montré que la baisse du pH était directement liée à l'assimilation de la source azotée par les levures. C'est donc le métabolisme de la levure qui est directement responsable de cette chute. La remontée par contre est due à un phénomène physico-chimique. La production d'alcool à partir des sucres entraîne une modification des dissociations des constituants du moût et principalement des acides organiques présents initialement dans le moût. En présence d'éthanol, la dissociation est moins importante et il en résulte donc une concentration en protons plus faible et donc un pH plus élevé. Il a été montré que ces deux phénomènes (assimilation de l'azote et effet de l'éthanol sur les dissociations) sont les principaux responsables de l'évolution du pH lors de la fermentation des moûts. Dans nos conditions, les productions d'acides organiques ont été trop faibles pour influencer significativement la valeur du pH. Notons toutefois que toutes les fermentations ont été réalisées en absence d'acide tartrique. La présence de cet acide pourrait contribuer plus significativement que les autres sur l'évolution du pH dans la mesure où ses concentrations dans les moûts sont généralement assez élevées.

La mise en évidence de ces phénomènes a été capitalisée par un modèle mathématique de calcul de pH du moût. Lorsque la composition du milieu est parfaitement connue, en entrant toutes les concentrations des constituants dans le modèle, le pH calculé est alors en adéquation avec le pH mesuré dans le milieu. Ceci a permis de valider toutes les équations d'équilibres de dissociation, de représentations des grandeurs physiques et la stratégie de résolution du modèle.

Pour un moût réel de fermentation, la totalité des constituants présents ne peut bien sûr pas être connue. Nous avons alors choisi de doser un grand nombre de composés et d'entrer leur concentration dans le modèle. L'écart entre le pH calculé et le pH expérimental est alors

annulé par un composé fictif qui permet de caler le calcul initial à la mesure initiale. Pour le moût testé, avec les constituants qui ont été mesurés, ce composé doit être un anion. Pour la suite de la fermentation, le modèle est alors capable de calculer le pH du moût à partir des évolutions des constituants initiaux, la concentration de 'l'anion fictif' calculée au point initial restant constante.

Ce modèle a été validé lors de fermentations sur des moûts synthétiques de composition parfaitement maîtrisés. Il a pu ensuite être utilisé pour tester différentes hypothèses sur les mécanismes d'assimilation des acides aminés par les levures. En effet, si l'effet de l'assimilation des ions ammonium sur le pH est bien décrit dans la bibliographie avec l'éjection d'un proton pour chaque mole de NH_4^+ consommée, l'effet de l'assimilation des acides aminés est beaucoup plus flou. Nous avons alors pu formuler différentes hypothèses qui ont été confrontées aux calculs du modèle. Certaines ont pu ainsi être invalidées, le modèle montrant que les pH qui en résulteraient seraient plus faibles ou plus forts que ceux obtenus. L'hypothèse finalement retenue est que la charge électrique globale de l'acide aminé dans le moût conditionne l'effet sur le pH. Suivant ses valeurs de constantes de dissociations, au pH des moûts, un acide aminé va être globalement chargé positivement ou neutre. Son assimilation entraînera l'éjection dans le milieu d'autant de protons que sa charge de façon à assurer la conservation des charges électriques. Cette hypothèse a permis de bien représenter tous nos résultats expérimentaux.

Dans le temps imparti pour ce travail de thèse, plusieurs approfondissements et développements n'ont pu être réalisés.

Une des premières poursuites à cette étude serait de valider définitivement l'hypothèse de l'effet sur le pH de l'assimilation des acides aminés. Pour cela, il faudrait faire varier dans un milieu synthétique les teneurs initiales des acides aminés et les faire fermenter. Augmenter la proportion des acides aminés fortement dissociés au pH du moût devrait augmenter la baisse du pH en cours de la fermentation et inversement.

Une autre poursuite pour ce travail serait également d'approfondir le concept du composé fictif calculé initialement pour 'coller' au pH initial mesuré. Notamment, il serait intéressant de voir s'il est possible, sans changer la précision du modèle, d'intégrer dans cette grandeur des constituants actuellement mesurés dans le modèle. Ceci permettrait de réduire le nombre d'analyses nécessaires pour l'initialisation du modèle. Certains acides organiques

minoritaires et cations doivent notamment pouvoir être pris en compte dans ce composé fictif sans que cela n'altère la qualité des résultats.

A plus long terme, l'extension du modèle à d'autres variables du procédé est aussi envisageable. Le modèle actuel étant basé sur une température de 20°C, il serait intéressant de tester la sensibilité du pH à ce paramètre et de l'intégrer dans ce modèle si il est significatif. En particulier, l'effet sur les dissociations devrait être étudié. Tester l'effet sur le pH de l'utilisation d'autres souches de levures de fermentation serait également intéressant. Par ailleurs, réaliser des fermentations avec les technologies de vinification en rouge permettrait de vérifier si les phénomènes observés dans le cas de vinifications en blancs se reproduisent.

Toujours, sur le développement du modèle, il serait intéressant d'établir les cinétiques de production et de consommation des composés influençant le pH au cours de la fermentation. Coupler ces lois cinétiques au modèle de calcul du pH permettrait de simuler dynamiquement l'évolution du pH tout au long de la fermentation.

L'utilisation de ce modèle dans un contexte industriel peut être envisagé sous différents aspects. Une première utilisation pourrait être la prédiction du pH du moût en fin de fermentation à partir de la connaissance de la composition et du pH du moût initial. L'œnologue ne sait pas actuellement évaluer la valeur du pH qu'il obtiendra à la fin de la fermentation. Connaître cette valeur lui permettrait de faire des corrections éventuelles sur la composition du moût en début de fermentation afin d'augmenter ou diminuer le pH final. La simulation de l'impact d'ajouts de composés comme l'azote ou l'acide tartrique (pratiques assez répandues) pourrait lui permettre de mieux maîtriser les doses ajoutées.

Une autre utilisation du modèle serait de suivre en ligne la fermentation par la seule mesure du pH. Celle-ci renseignerait sur l'avancement des réactions de consommation d'azote et de production d'éthanol et permettrait un pilotage de la fermentation.

Enfin, ce modèle de calcul du pH développé pour la fermentation alcoolique de moût de raisin pourrait être utilisé dans d'autres secteurs industriels. Il pourrait être facilement adapté aux spécificités d'autres milieux. Un exemple parmi d'autres, pour rester dans le domaine agro-alimentaire, serait de l'utiliser dans l'industrie laitière où le pH joue un rôle prépondérant sur l'obtention du produit fini.

References bibliographiques

Abolghasem Jouyban, Shahla Soltanpour and Hak-Kim Chan, (2004), A simple relationship between dielectric constant of mixed solvents with solvent composition and temperature. *International Journal of Pharmaceutics*, 269, 353-360

Alvarez M., Moren I.M., Jos A.M., Camean A.M., Gustavo Gonzalez A., (2007), Study of mineral profile of Montilla-Moriles “fino” wines using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 391–395

Aris R., (1989), Elementary chemical reactor analysis. Ed. Butterworths reprint Series in chemical engineering

Barandica J. M, Santos A., Marquina D., López F, Acosta F.J. and Peinado J. M., (1999), A mathematical model for toxin accumulation by killer yeasts based on the yeast population growth. *Journal of Applied Microbiology*, 86(5), 805

Becker J.U., Betz A., (1972), Membrane transport as controlling pace-maker of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *biochim. Biophys. Acta*, 274, 584-597.

Beltran, G. Novo, M. Rozès, N. Mas, A. Guillamón, JM., (2004), Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*. 4, 625-632.

Bely M., Sablayrolles J.M., Barre P., (1990), Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng.*, 4, 246-252.

Bisson L.F., Coons D.M., Kruckeberg A.L. et Lewis D.A., (1993), Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 259–308.

Blouin J. et Peynaud E. Connaissance et travail du vin. 2001. Dunod Ed., Paris.

Busturia A. et Lagunas R., (1986), Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., 132, 379-385.

Cantarelli, C., (1957), On the activation of alcoholic fermentation in winemaking, part II . Am . J . Enol . Vitic . 8:167-175

Carnahan B., Luther H.A, Wilkes J.O., (1969) Applied Numerical Methods, Krieger Publishing Company,

Cartwright C.P., Rose A.H., Calderbank J., Keenan M.H.J. (1989) Responses to the chemical environment. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.), The Yeasts 3, 2: 5–35. Academic Press.

Castrillo J.I., DE Miguel I., Ugalde U.O. (1995) Proton production and consumption pathways in yeasts metabolism. A chemostat culture analysis Yeast 11, 1353-1365.

Chien Y.W. (1984) Solubilization of metronidazole by water miscible multi-cosolvents and water-soluble vitamin. J. Parent. Sci. technol. 38, 32-36

Cockburn M, Earnshaw P et Eddy AA., (1975), The stoichiometry of the absorption of protons with phosphate and L-glutamate by yeast of the genus *Saccharomyces*. *Biochem J.* 146(3):705–712.

Cooper T. G., (1982), in The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression (Strathern, J. N. , Jones, E. W. , and Broach, J., eds) , pp. 39-99, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

D'Amore T., Russell I. et Stewart G.G., (1989), Sugar utilization by yeast during fermentation. J. Ind. Microbiol., 4, 315-324.

Darte, C. et M. Grenson., (1975), Evidence for three glutamic acid transporting system with specialized physiological functions in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 67, 1028-1033.

Day R.A. and Underwood A.L., (1991), Quantitative analyses, 6th ed. Prentice-hall, New jersey.

Decroocq D., (1964), la constante diélectrique statique des mélanges liquides. Bull. Soc. Chim.,127-136

Denbigh K., (1981), The principles of chemical equilibrium, with applications in chemistry and chemical Engineering, 4^{ème} Ed., Edition Cambridge University Press, Cambridge, 494 p.

Devatine A., (2002), Maîtrise de l'acidité des vins : Désacidification par précipitation de malates de calcium et simulation des équilibres physico-chimiques a l'aide du logiciel MEXTAR, thèse de doctorat de l'INP,

Dubois E. et Grenson M., (1979), Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. Mol. Gen. Genet. 175, 7-76.

Dumanovic D., Kosanovic D.J., Arkakovic D. et Jovanovic J., (1992), Solubilization of ipronidazole by co-solvents. Pharmazie. 47, 603-607

Eddy A.A., (1982), "Mechanisms of Solute Transport in Selected Eukaryotic microorganisms. in : Rose A.H., Morris J.G. (eds) "Advances in Microbial Physiology" 23, 1-78.

Eddy, A. A. et Nowacki, J. A., (1971), Stoicheiometrical proton and potassium ion movements accompanying the absorption of amino acids by the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochem. J. 122(5), 701-711

Egbosimba E.E., Slaughter J.C., (1987), The influence of ammonium permease activity and carbon source on the uptake of ammonium from simple defined media by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., 133, 375-379.

Gancedo J.M., Clifton D., Fraenkel D.G., (1977), Yeast hexokinase mutants. J. Biol. Chem. 252, 4443-4444.

Gerbaud V., (1996), Effet des polysaccharides sur la cristallisation du bitartrate de potassium en solutions hydroalcooliques et dans les vins. Thèse de doctorat à l'INP

Gillies RJ, Deamer DW., (1979), Intracellular pH changes during the cell cycle in *Tetrahymena*. *J Cell Physiol.* 100(1), 23–31.

Greasham R.L. et Moat A.G., (1973), Amino acid transport in a polyaromatic amino acid auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 115, 975–981

Gregory M.E., Keenan M.H.J., Rose A.H., (1982), Accumulation of L-asparagine by *Saccharomyces cerevisiae* X-2180. *J. Gen. Microbiol., J. Biochem.*, 128, 2557-2562.

Grenson M., Mousset M. Wiame J.M. et Béchet J., (1966), Multiplicity of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* 127, 325-338

Grenson M., (1966), Multiplicity of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Evidence for a specific lysine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* 127, 339-346

Grenson M., Hou C., Crabeel M., (1970), Multiplicity of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for general amino acid permease. *Journal of Bacteriology* 103(3), 770-777

Harvie C.E., Moller N., Weare J.H., (1984), The prediction of mineral solubility in natural waters: the Na-K-Mg-Ca-H-Cl-SO₄-HCO₃-CO₃-CO₂-H₂O system to high ionic strength at 25°C, *Geochemica et Cosmochemica Acta*, 48, 723-751

Henscke P.A., Jiranek V., (1991), H₂S formation during fermentation : effect of nitrogen composition in model grape musts. International symposium on nitrogen in grapes and wines. American Society of Enology and Viticulture, 18-19 Juin, Seattle, USA

Hernandez-Orte P., M.J. Ibarz, J. Cacho, V. Ferreira., (2006), Addition of acids to grape juice of merlot variety : Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. *Food chemistry* 98, 300-310

Horák, J., (1986), Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta* 864, 223-256.

Horak J. et Kotyk A. (1986), Energetics of L-proline uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 857 (2), 173-179

Imai T. et Ohno T., (1995a), Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *Journal of Biotechnology*, 38(2), 165-172

Imai T. et Ohno T., (1995b), The Relationship between Viability and Intracellular pH in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3604-3608

Jiranek V., Langridge P., Henschke P.A., (1990), Nitrogen requirements of yeast during wine fermentation. Proceedings of the 7th Australian Wine Industry Technical Conference (Adelaide, 1989), pp. 166-171. Williams P.J., Davidson D.M., Lee T.H. editors, Australian Industrial Publishers S.A., Adelaide, Australie.

Jiranek V., (1992), PhD thesis, University of Adelaide, Australie.

Jiranek V., Langridge P., Henschke P.A., (1995), Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 75–83.

Jukes T. H. et Schmidt Carl L. A., (1934), The apparent dissociation constant of certain amino acids and related substances in water-ethanol mixtures *J. Biol. Chem.* 105: 359-371.

Keenan M.H.J., Rose A.H. and Silverman B.W., (1982), Effect of plasma membrane phospholipid unsaturation on solute transport into *Phanerochaete chrysosporium* NCYC 366. *J Gen Microbiol* 128:2547–2556

Koch et Sajak (1959), A Review and Some Studies on Grape Protein. *Am. J. Enol. Vitic.* 10:3:114-123

Kotyk A., (1989), Proton extrusion in yeast. In Fleischer S. and Fleischer B. (Eds) Method in enzymology, vol 174 (Biomembranes, part U). Academic Press, New York, 592-603

Lafon-Lafourcade S. et Peynaud E., (1959), Dosage. microbiologique des acides aminés des moûts de raisins et des vins. *Vitis* 2:45-56

Lafon-Lafourcade S., Guimberteau G., (1962), Evolution des amino-acides au cours de la maturation des raisins. *Vitis*. 3, 130–135.

Lange H., Bavouzet J.M., Taillandier P. et Delorme, C., (1993) Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspension. *Biotechnol. Techniques*. 7, 223–228.

Lasko P.F., Brandiss M.C., (1981), Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 148, 241-247.

Lemmel S. A., Heimsch R. C., Korus R. A., (1980), Kinetics of Growth and Amylase Production of *Saccharomycopsis fibuligera* on Potato Processing Wastewater. *Appl Environ Microbiol*, 39(2): 387-393.

Lewis, G. N., et M. Randall., (1961), *In* Thermodynamics. K. S. Pitzer, and L. Brewer, editors. McGraw-Hill, New York. 164-182, 665-668.

Magasanik B., (1992), Regulation of nitrogen utilization. In The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces* gene expression. (ed. E.W. Jones, J.R. Pringle and J.R. Broach), Vol. 2, pp. 283-317. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Maitra P.K., (1970), A glucokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 245, 2423-2431.

Mckinnon Anthony J., Scollary Geoffrey R., Solomon David H. and Williams Patrick J., (1995), The Influence of Wine Components on the Spontaneous Precipitation of Calcium L(+)-Tartrate in a Model Wine Solution. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(4), 509-517

Miller G.L., (1959), Use of dinitrosalysilic reagent for determination of residual sugar. Analytica Chem. 31, 426-428

Mullin J.W. and Sôhnel O. (1977), Expression of supersaturation in cristallization studies. Chemical engineering Science. 32(7), 683-686.

Ough L. D. (1964) in Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler, R., ed), Vol.IV, pp.91-98.

Ough C.S. (1969). Substances extracted during skin contact with white musts, general wine composition and quality changes with contact time. Am. J. Enol. Vitic. 20, 93-100

Ough C.S. et Kriel A., (1985), Ammonia concentrations of musts of different grape cultivars and vineyards in the Stellenbosch area. S. Afr. J. Enol. Vitic. 6, 7-11.

Ozcan S., Johnston M., (1995), Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. Mol. Cell. Biol., 15, 1564-1572.

Payne J.W., Nisbet T.M (1981), Continuous monitoring of substrate uptake by microorganisms using fluorescamine : Application to peptide transport by *Saccharomyces cerevisiae* and *Streptococcus faecalis*. J. Appl. Biochem., 3, 447-458.

Perry R.C. et Don Green, (1990), Perry's Chemical Engineers Handbook, 6^{ème} édition, MacGraw-Hill Compagny.

Prakongpan S. et Nagai T., (1984), Solubility of acetaminophen in cosolvents. Chemical and pharmaceutical bulletin , 32, 340-343

Ratsimba B., (1990), Cristallisation du bitartrate de potassium à partir de solutions hydroalcooliques- Extensions des résultats à l'œnologie. Thèse de doctorat à l'INP

Renouf V., Lonvaud-Funel A., (2006a), Le suivi microbiologique du vin. Partie 1 : De la parcelle au conditionnement : un outil pour une œnologie raisonnée. Revue des œnologues N°118

Renouf V., Lonvaud-Funel A., (2006b), Le suivi microbiologique du vin. Partie 2 : Conséils pratiques pour la mise en place d'un suivi microbiologique. Revue des œnologues N°119.

Reid R.C., Praunzitz J.M. et Poling D.E. (1987) The properties of gases and liquids, 4^{ème} édition, Macgraw-hill.

Renon H. (1986) Electrolyte solutions. Fluid Phase Equilibria, 30, 181-195

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B. et Lonvaud A., (1998), Tarité d'œnologie. Tome 1. Microbiologie du vin. Vinification. Édition Française

Righelato C.R., Rose D. et Westwood A. W., (1981), Kinetics of ethanol production by yeast in continuous culture. Biotechnology Letters 3(1), 3-8.

Roon R.J., Even H.L., Dunlop P., Larimore F.L., (1975), Methylamine and ammonium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bact., 122, 502-509.

Rose A.H. (1987) : Responses to the chemical environment. *In the Yeasts*, Volume 2, 2nd édition, Physiology and biochemistry of yeasts, pp 5-40. Rose A.H., Harrison J.S. editors, Academic Press, Londres, Royaume-Uni.

Rupasinghe, H.P.V. et Clegg S., (2007), Total antioxidant capacity, total phenolic, mineral element, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. J.Food Comp. Anal. 20, 133.

Salmon J.M., (1989), Effect of sugar transport inactivation in *saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. Appl. Environ. Microbiol., 55, 953-958

Salmon J.M., (1998), Relations levure- milieu, *In* : OEnologie - fondements scientifiques et technologiques, pp. 415-444, ed. FLANZY C., Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, France.

Salmon J.M., Vincent O., Mauricio J.C., Bely M., Barre P., (1993), Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am. J. Enol. Vit.*, 44, 127-133

Salmon J.M., (1994), Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. *Biotech. Lett.*, 16, 89-94.

Salmon J.M., (2008), Communication personnelle.

Sato T., Ohsumi Y. et Anraku Y., (1984), Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/amino acid antiport systems. *Biol. Chem.*, 259(18), 11505-11508

Schaaf I., Heinisch J., Zimmermann F.K., (1989), Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*, 5, 285-290.

Serrano R., Delafuente G., (1974), Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem.* 5(3), 161–171

Seaston A., Inkson C. et Eddy A.A., (1973), The absorption of protons with specific amino acids and carbhydrates by yeast. *Biochem. J.* 134, 1031-1043

Sigler K., Knotkova A. et Kotyk A., (1981), Factor governing substrate induced generation and extrusion of proton in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 643, 572-582

Stokes R.H. et Robinson R.A., (1948), Ionic hydration and activity in electrolyte solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 70, 1870-1878

Surdin Y., Sly W., Sire J., Bordes A.M. et De Robiichon-Szulmajster H., (1965), Propriétés et contrôle génétique de système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta, 107, 546-566

Taillandier P., Ramon-Portugal F., Fuster A. et Strehaiano P., (2007), Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. Food Microbiology 95-100

Taillandier P. et Bonnet J., (2005), Le vin, Compositions et transformation chimiques. Paris : lavoisier.

Thomas K.C., Hynes S.H. et Ingledew W.M., (2002), Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1616-1623

Torija M.J., Beltran G., Novo M., Poblet M., Rozès N., Mas A. et Guillamón J.M., (2003), Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: study of their buffering capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 51(4), 916 -922

Usseglio-Tomasset L., Bosia P.D. (1978), Determinazione delle costanti di dissociazione dei principali acidi del vino in soluzioni idroalcoliche di interesse enologico, Rivista di viticoltura e di enologia di Conegliano, 31, 380-403

Van de Aar P.C., Lopes T.S., Klotwijk J., Groeneveld Ph., Van Verseveld H.W., Stouthamer A.H., (1990), Consequences of phosphoglycerate kinase overproduction for the growth and physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. microbiol. Biotechnol. 32(5), 577-587

Vasic-Racki D., Kragl U., Conrad D., Wandrey C., (1998), Modelling of yeast alcohol dehydrogenase catalysed production of chiral alcohols. Chem. biochem. eng. q. 12(2) 87-95
physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 577-587.

Woodward J R. et Kornberg H.L., (1980), Membrane proteins associated with amino acid transport by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Biochemical Journal 192, 659-64

Won J.I. , Yang Y.L., Kim B.G. et Choi C.Y., (1993), Adaptative control of specific growth rate based on proton production in anaerobic fed-batch culture. *Biotechnolgy letters* 15 (5), 511-516

Yokotsuka K. et FuKui M., (2002), Changes in nitrogen compounds in berries of six grape cultivars during ripening over twoyears. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 69-77

Zemaitis J.F., Clark D.M., Rafal M, Scrivner N.C., (1986), *Handbook of Aqueous Electrolyte Thermodynamics: Theory and Application* , edition DIPPR, 36-56

Zhang D.-S. et Lovitt R.W., (2005), Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugars mixtures. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 565-572

Annexe

Tableau 1.a. Données expérimentales de la composition du moût à partir desquelles la constante diélectrique et la masse volumique ont été déterminées.

Composition du moût											
En masse (Kg)			En volume (m3)			Volume total	Volume massique (m3/Kg)	Masse volumique à 20 °C (Kg/m3)	Constante diélectrique absolue à 20 °C	concentration (Kg/m3)	
Eau	Sucre	alc	Eau	Sucre	alc					Eau	Sucre
0,8697	0,2000	0,0000	0,8713	0,1445	0,0000	1,0158	0,9496	1,0531	76,2562	0,8562	196,8953
0,8685	0,1800	0,0030	0,8701	0,1301	0,0035	1,0036	0,9545	1,0477	75,6248	0,8654	179,3502
0,8673	0,1600	0,0086	0,8689	0,1156	0,0101	0,9945	0,9601	1,0416	75,0695	0,8721	160,8821
0,8661	0,1400	0,0096	0,8677	0,1012	0,0112	0,9800	0,9649	1,0364	74,3797	0,8837	142,8522
0,8649	0,1200	0,0148	0,8665	0,0867	0,0173	0,9705	0,9708	1,0301	73,8127	0,8912	123,6526
0,8637	0,1000	0,0293	0,8653	0,0723	0,0343	0,9718	0,9786	1,0219	73,5175	0,8888	102,9062
0,8625	0,0800	0,0343	0,8641	0,0578	0,0401	0,9620	0,9848	1,0154	72,9446	0,8966	83,1642
0,8613	0,0600	0,0393	0,8629	0,0434	0,0459	0,9521	0,9912	1,0089	72,3718	0,9046	63,0156
0,8601	0,0400	0,0460	0,8617	0,0289	0,0538	0,9443	0,9981	1,0019	71,8486	0,9108	42,3583
0,8589	0,0200	0,0480	0,8604	0,0145	0,0561	0,9310	1,0044	0,9956	71,1880	0,9225	21,4820
0,8577	0,0190	0,0500	0,8592	0,0137	0,0585	0,9314	1,0051	0,9949	71,1187	0,9208	20,3989
0,8565	0,0180	0,0520	0,8580	0,0130	0,0608	0,9318	1,0058	0,9943	71,0494	0,9192	19,3167
0,8553	0,0170	0,0540	0,8568	0,0123	0,0631	0,9323	1,0064	0,9936	70,9801	0,9175	18,2354
0,8541	0,0160	0,0560	0,8556	0,0116	0,0655	0,9327	1,0071	0,9930	70,9108	0,9158	17,1552
0,8529	0,0150	0,0630	0,8544	0,0108	0,0736	0,9389	1,0086	0,9915	70,9877	0,9084	15,9758
0,8517	0,0140	0,0650	0,8532	0,0101	0,0760	0,9393	1,0093	0,9908	70,9184	0,9067	14,9041
0,8505	0,0130	0,0670	0,8520	0,0094	0,0783	0,9397	1,0099	0,9902	70,8491	0,9050	13,8335
0,8493	0,0120	0,0690	0,8508	0,0087	0,0807	0,9402	1,0106	0,9895	70,7798	0,9034	12,7638
0,8481	0,0110	0,0710	0,8496	0,0079	0,0830	0,9406	1,0113	0,9889	70,7105	0,9017	11,6950
0,8469	0,0100	0,0730	0,8484	0,0072	0,0853	0,9410	1,0119	0,9882	70,6412	0,9000	10,6271
0,8457	0,0090	0,0750	0,8472	0,0065	0,0877	0,9414	1,0126	0,9876	70,5719	0,8983	9,5602
0,8445	0,0080	0,0770	0,8460	0,0058	0,0900	0,9418	1,0132	0,9869	70,5026	0,8967	8,4942
0,8433	0,0070	0,0790	0,8448	0,0051	0,0924	0,9422	1,0139	0,9863	70,4333	0,8950	7,4292
0,8421	0,0060	0,0810	0,8436	0,0043	0,0947	0,9426	1,0146	0,9856	70,3640	0,8933	6,3651
0,8409	0,0050	0,0830	0,8424	0,0036	0,0970	0,9431	1,0152	0,9850	70,2947	0,8917	5,3019
0,8397	0,0040	0,0850	0,8412	0,0029	0,0994	0,9435	1,0159	0,9843	70,2254	0,8900	4,2397
0,8385	0,0030	0,0860	0,8400	0,0022	0,1005	0,9427	1,0164	0,9839	70,1269	0,8895	3,1823
0,8373	0,0020	0,0860	0,8388	0,0014	0,1005	0,9408	1,0167	0,9835	69,9991	0,8900	2,1259

Tableau 1.b. Détermination de la constante diélectrique et de la masse volumique d'une solution hydroalcoolique sucrée par solveur Excel à partir des du tableau 1.a.

Resolution par solveur excel (masse volumique)					Resolution par solveur excel (constante diélectrique absolue)				
Masse volumique	Erreur	A : masse volumique eau	B: coefficient sucre	C: coefficient alcool	Constante diélectrique	Erreur	A : constante diélectrique absolue eau	B: coefficient sucre	C: coefficient alcool
1,0532	1,0615E-08	0,998060	0,000279	-0,001405	77,8054	2,4001	71,478997	0,032131	-0,126839
1,0478	2,8912E-09				77,1941	2,4625			
1,0416	6,4447E-11				76,5119	2,0805			
1,0364	1,8681E-10				75,9167	2,3623			
1,0301	1,5987E-09				75,2174	1,9731			
1,0217	1,5850E-08				74,3209	0,6454			
1,0153	1,1953E-08				73,6073	0,4391			
1,0088	5,5234E-09				72,8806	0,2590			
1,0018	1,2388E-09				72,1107	0,0687			
0,9956	3,9943E-09				71,4082	0,0485			
0,9950	4,2249E-09				71,3417	0,0497			
0,9943	4,4203E-09				71,2752	0,0510			
0,9937	4,5777E-09				71,2088	0,0523			
0,9930	4,6948E-09				71,1423	0,0536			
0,9915	2,0995E-10				70,9935	0,0000			
0,9908	1,4824E-10				70,9273	0,0001			
0,9902	9,1272E-11				70,8612	0,0001			
0,9895	4,3895E-11				70,7951	0,0002			
0,9889	1,1497E-11				70,7291	0,0003			
0,9882	2,2455E-14				70,6630	0,0005			
0,9876	1,5967E-11				70,5971	0,0006			
0,9869	6,6375E-11				70,5311	0,0008			
0,9863	1,5884E-10				70,4652	0,0010			
0,9856	3,0148E-10				70,3993	0,0012			
0,9850	5,0298E-10				70,3334	0,0015			
0,9843	7,7256E-10				70,2676	0,0018			
0,9838	2,4634E-10				70,2177	0,0083			
0,9836	2,0138E-10				70,1838	0,0341			

Tableau 2. Les différentes ions minéraux contenus dans les milieux synthétiques. Seule la concentration en Cl^- diffère d'un milieu à l'autre : MS_NH4 : 1.45730E-03, MS300 : 5.0169E-01, MS_AA : 1.9640E-01 exprimée en g.L^{-1}

Ions minéraux	Symboles	Concentration (g.L^{-1})
Cations	A_{POT}	4.4041E-01
	A_{Cal}	4.2387E-02
	A_{Sod}	7.8598E-02
	A_{Mag}	2.4660E-02
Anions	A_{SO_4}	3.7726E-01
	A_{CL}	Selon le milieu
	A_{Zn}	1.45730E-03
	A_{Cu}	2.54500E-04
	A_{I}	7.5949E-04
	A_{Pant}	1.3738E-03
	A_{Tiam}	1.97372E-04
	$A_{\text{Co (H}_2\text{O)}_6}$	2.80647E-04
	A_{Mo7O24}	9.0721E-04
	A_{Mn}	1.3002E-03

Composition et mode de préparation de la solution mère d'acides aminés

Dans un Becher de 1 L, dissoudre 20 g de NaHCO_3 dans 500 mL d'eau MilliQ préalablement chauffée à 100°C.

Ajouter successivement les éléments du tableau ci-dessous

Tableau 3. Acides aminés de la solution mère.

Eléments	Quantité (g/L)	Remarques
Tyrosine	1,4	
Tryptophane	13,7	
Isoleucine	2,5	
Acide aspartique	3,4	Ajout lentement car dégagement de CO_2
Acide glutamique	9,2	Ajout lentement car dégagement de CO_2
Arginine	28,6	
Leucine	3,7	Rincer le Becher de pesée avec de l'eau bouillante
Thréonine	5,8	
Glycine	1,4	
Glutamine	38,6	
Alanine	11,1	
Valine	3,4	
Méthionine	2,4	
Phénylalanine	2,9	
Sérine	6,0	
Histidine	2,5	
Lysine	1,3	
Cystéine	1,0	
Proline	46,8	

Laisser refroidir puis transférer dans une fiole jaugée de 1 Litre. Rincer le Becher et récupérer soigneusement les eaux de rinçage. Homogénéiser la solution jusqu'à dissolution complète.

Ajuster le volume à 1 Litre avec de l'eau MilliQ. Repartir la solution en flacon à usage unique. Dater et identifier les flacons. Stockage au congélateur.

Composition et mode de préparation de la solution mère de facteurs anaérobies

Pour 100 mL de solution mère, peser 1,5 g d'ergostérol, les transférer dans un Erlen. Ajouter 0,5 mL d'acide oléique à partir d'un tube eppendorf. Ajouter dans l'Erlen la solution du mélange éthanol pur/Tween 80 (v/v) en rinçant l'eppendorf. Chauffer pendant 5 min au bain marie à 70°C puis agiter pour la dissolution complète.

Repartir la solution en 10 aliquotes de 10 mL dans des tubes Falcons stériles de 15 mL. Les conserver au frigo à 4°C après identification et datation.

Tableau 4. Composants de la solution mère de facteurs anaérobies.

Eléments	Ref. Sigma
Ergostérol	E 6510
Acide oléique	O 1008
Tween 80	P 1754
Ethanol pur	

Composition et mode de préparation de la solution mère de vitamines

Dans un Becher de 1 Litre contenant environ 300 mL d'eau MilliQ, ajouter successivement les éléments du tableau ci-dessous

Tableau 5. Composants de la solution mère de vitamines

Eléments	Quantité (g/L)
Myo-Inositol	2,0
Pantothénate de calcium	0,15
Thiamine hydrochloryde	0,025
Acide nicotinique	0,2
Pyridoxine	0,025
Biotine	3 mL

Transférer dans une fiole jaugée de 1 Litre ; rincer le Becher et récupérer soigneusement les eaux de rinçages. Homogénéiser la solution et ajuster le volume à 1 Litre avec de l'eau

MilliQ. Repartir la solution en flacons à usage unique. Dater et identifier les flacons. Stockage au congélateur.

Composition et mode de préparation de la solution mère d'oligo-éléments

Dans un Becher de 1 Litre contenant environ 300 mL d'eau MilliQ, ajouter successivement les éléments du tableau ci-dessous

Tableau 6. Composants de la solution mère d'oligo-éléments

Eléments	Quantité (g/L)
MnSO ₄ , H ₂ O	4
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4
CuSO ₄ , 5H ₂ O	1
KI	1
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,4
H ₃ BO ₃	1
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄	1

Transférer dans une fiole jaugée de 1 Litre ; rincer le Becher et récupérer soigneusement les eaux de rinçages. Homogénéiser la solution et ajuster le volume à 1 Litre avec de l'eau MilliQ.

Repartir et stériliser la solution par filtration dans des flacons stériles. Dater et identifier les flacons puis stockage au réfrigérateur.

RESUME

Ce travail présente une analyse et une interprétation métabolique de l'évolution du pH au cours de la fermentation alcoolique de moûts de raisins par *Saccharomyces cerevisiae*.

La variation de la composition du milieu au cours de la fermentation ne suffit pas à expliquer les variations du pH observées expérimentalement. Si l'influence du métabolisme de l'azote ammoniacal sur le pH est bien développée dans la littérature, les résultats sont plus incertains concernant l'assimilation des acides aminés. Afin de discriminer différentes hypothèses, un modèle de calcul du pH a été développé. Le pH est calculé par la résolution d'un système d'équations algébriques non linéaires constitué des équations de conservation de matière, des équilibres chimiques et du principe de l'électroneutralité de la solution. La constante de dissociation des acides organiques est fonction de l'alcool et de la température. Les coefficients d'activité moyens et ionique sont déterminés par la loi de Debye-Hückel. Une formulation originale basée sur la notion d'invariants de réaction a permis de faciliter l'étape d'initialisation du système. Le modèle a été validé sur des milieux synthétiques parfaitement maîtrisés.

L'application du modèle au cas de la fermentation sur milieux dont la source azotée est constituée uniquement d'azote ammoniacal a donné des résultats très satisfaisants. Il a permis d'expliquer la chute de pH observée dans une première phase par l'assimilation de la source azotée. Une fois le substrat azoté épuisé, l'augmentation de pH est directement liée à la production d'alcool. Les acides organiques produits pendant la fermentation n'exercent qu'une très faible influence sur l'évolution du pH.

L'utilisation du modèle a permis d'invalider deux hypothèses concernant l'impact de l'assimilation des acides aminés sur le pH. L'hypothèse la plus probable est que l'assimilation des molécules d'acides aminés chargés positivement conduit à l'émission de protons dans le milieu extra cellulaire.

Mots clés :

- | | |
|-----------------------------------|-----------------|
| - Fermentation alcoolique | - pH |
| - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | - Modélisation |
| - Moût de raisins | - Acides aminés |
| - Ethanol | |
-

Abstract

This work presents an analysis and a metabolic interpretation of the evolution of the pH during grape must alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. The changes in the composition of the medium during fermentation are not enough to explain the variations of the pH observed in experiments. If the influence of the metabolism of ammoniac on the pH is well developed in the literature, the results are more dubious concerning the assimilation of the amino acids. In order to discriminate various assumptions, a model of pH calculation was developed. The pH is calculated by the resolution of a system of nonlinear algebraic equations consisted of the mass balances, chemical equilibriums and electro neutrality equation. The constant of dissociation of the organic acids is a function of alcohol and the temperature. The average activity coefficients are determined by the Debye-Hückel law. An original formulation based on the concept of invariants of reaction made it possible to facilitate the initialization of the system. The model was validated on perfectly controlled synthetic mediums.

The application of the model to fermentation media whose the nitrogen source is made up only of ammoniac gave very satisfactory results. It made it possible to explain the pH decrease observed by the assimilation of the nitrogen source. Once the exhausted nitrogen source, the increase in pH is directly related to the production of alcohol. The organic acids produced during fermentation exert only a very weak influence on the evolution of the pH.

The use of the model made it possible to invalidate two assumptions concerning the impact of the assimilation of the amino acids on the pH. The most probable assumption is that the assimilation of the molecules of acids amino charged positively led to the emission of protons in the cellular extra medium.